

**Versuche zur Gewinnung
komplementbindender und präzipitierender
Seren gegen das Tollwutvirus unter
Verwendung des Flury-Stammes**

Rolf Manz

1964

Aus dem Institut für Zoonosenforschung an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität Frankfurt am Main

(Direktor : Prof. Dr. Gerhard Schoop)

VERSUCHE ZUR GEWINNUNG KOMPLEMENTBINDENDER UND
PRÄZIPITIERENDER SEREN GEGEN DAS TOLLWUTVIRUS UNTER
VERWENDUNG DES FLURY-STAMMES

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der gesamten Medizin

der hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

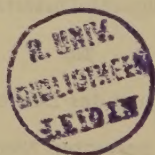
vorgelegt von

Rolf Manz

aus Gießen

Frankfurt/M. 1963

Dekan : Prof. Dr. J. Frey
Referent : Prof. Dr. G. Schoop
Korreferent : Priv. Doz. Dr. May
Mündliche Prüfung : 6. Februar 1964



HYMNEN

- I. Vater
- II. Mutter
- III. Kind
- IV. Ehe
- V. Familie
- VI. Staat
- VII. Kirche
- VIII. Welt
- IX. Menschheit
- X. Gott

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT

- I. Vater
- II. Mutter
- III. Kind
- IV. Ehe
- V. Familie
- VI. Staat
- VII. Kirche
- VIII. Welt
- IX. Menschheit
- X. Gott
- XI. Dankbarkeit
- XII. Liebe
- XIII. Hoffnung
- XIV. Frieden
- XV. Gerechtigkeit
- XVI. Wahrheit
- XVII. Schönheit
- XVIII. Glück
- XIX. Gesundheit
- XX. Wohlstand
- XXI. Ruhm
- XXII. Macht
- XXIII. Wissen
- XXIV. Kunst
- XXV. Wissenschaft
- XXVI. Religion
- XXVII. Philosophie
- XXVIII. Literatur
- XXIX. Musik
- XXX. Sport
- XXXI. Freizeit
- XXXII. Reisen
- XXXIII. Essen
- XXXIV. Trinken
- XXXV. Schlafen
- XXXVI. Arbeiten
- XXXVII. Lernen
- XXXVIII. Spielen
- XXXIX. Denken
- XL. Fühlen
- XLI. Handeln
- XLII. Sein
- XLIII. Werden
- XLIV. Vergehen
- XLV. Sterben
- XLVI. Leben
- XLVII. Existenz
- XLVIII. Essenz
- XLIX. Substanz
- L. Qualität
- LXI. Quantität
- LXII. Maß
- LXIII. Grad
- LXIV. Stufe
- LXV. Rang
- LXVI. Klasse
- LXVII. Gruppe
- LXVIII. Kategorie
- LXIX. Typ
- LXX. Form
- LXXI. Gestalt
- LXXII. Figur
- LXXIII. Bild
- LXXIV. Abbild
- LXXV. Spiegelbild
- LXXVI. Schattenbild
- LXXVII. Reflex
- LXXVIII. Echo
- LXXIX. Widerhall
- LXXX. Resonanz
- LXXXI. Schwingung
- LXXXII. Wellenlänge
- LXXXIII. Frequenz
- LXXXIV. Amplitude
- LXXXV. Phase
- LXXXVI. Zeit
- LXXXVII. Raum
- LXXXVIII. Materie
- LXXXIX. Energie
- LXXXX. Kraft
- LXXXXI. Impuls
- LXXXXII. Moment
- LXXXXIII. Drehmoment
- LXXXXIV. Arbeit
- LXXXXV. Leistung
- LXXXXVI. Effizienz
- LXXXXVII. Produktivität
- LXXXXVIII. Rendite
- LXXXXIX. Gewinn
- LXXXXX. Verlust
- LXXXXXI. Schaden
- LXXXXXII. Kosten
- LXXXXXIII. Preis
- LXXXXXIV. Wert
- LXXXXXV. Nutzen
- LXXXXXVI. Vorteil
- LXXXXXVII. Nachteil
- LXXXXXVIII. Risiko
- LXXXXXIX. Gefahr
- LXXXXXX. Gefahr
- LXXXXXXI. Gefahr
- LXXXXXXII. Gefahr
- LXXXXXXIII. Gefahr
- LXXXXXXIV. Gefahr
- LXXXXXXV. Gefahr
- LXXXXXXVI. Gefahr
- LXXXXXXVII. Gefahr
- LXXXXXXVIII. Gefahr
- LXXXXXXIX. Gefahr
- LXXXXXXX. Gefahr

Inhalts-Verzeichnis

Einleitung

1. LITERATUR

- A Vorwort
- B Der Flury-Stamm
 - I. Herkunft
 - II. Eikultur und Verhalten des Virus auf dem Hühnerei
 - III. Tierpathogenität
 - IV. Vaccine
 - V. Nachweis
 - a) an der saugenden Maus
 - b) am 1-Tage bebrüteten Hühnerei
- C Komplementbindungsreaktion (KBR)
 - I. Übersicht, Spezifität
 - II. Antigenherstellung
 - a) Ausgangsmaterial
 - b) Extraktionsmittel und Aufschließen des Antigenmaterials
 - c) %igkeit des verwendeten Antigenmaterials
 - d) Suspensionsmittel
 - e) Zentrifugation
 - III. Hyperimmunserum-Gewinnung
 - a) Versuchstiere
 - b) Injektionspräparate und Applikationsmodus
 - c) Serumgewinnung
- D Präzipitationsreaktion
 - a) Antigengewinnung
 - b) Hyperimmunserum-Gewinnung
 - c) Prinzip und Art des Mediums zur Durchführung der Präzipitationsreaktion
 - d) Ablesen der Reaktion
 - e) Spezifität der Reaktion
- E Infektiöses und komplementbindendes Antigen
- F Lösliches Antigen (S-Antigen)

2. EIGENE VERSUCHE

Material und Technik

A Der Flury-Stamm

- I. Züchtung im bebrüteten Hühnerei
- II. Nachweis
 - a) an der saugenden Maus
 - b) am 3-Tage bebrüteten Hühnerei

B Gewinnung der Seren

- I. Gewinnung der Flury-Antiseren
 - a) Immunisierungsmaterial
 - b) Versuchstiere
 - c) Injektionsmodus
 - d) Serumgewinnung
- II. Positive Vergleichsseren
- III. Gewinnung der Kontrollseren

C Antigenherstellung

- I. Zur KBR
- II. Zur Präzipitationsreaktion

D Komplementbindungsreaktion (KBR)

- I. Vorversuch
- II. Hauptversuch

E Präzipitationsreaktion

3. ERGEBNISSE

A Der Flury-Stamm

- I. Eikultur
- II. Nachweis

B Komplementbindungsreaktion (KBR)

- I. Einfluß der Dichte der Antigensuspension
- II. Prüfung der virushaltigen und nicht-virushaltigen Antigene
 - a) Vergleichsseren
 - b) Vor Immunisierung gewonnene Seren
 - c) Flury-Antiseren
 - d) Anti-Embryogehirn-Seren
 - d) S-Seren
 - f) Rinder- und Pferdenormalseren
- III. Reaktion der einzelnen Kaninchenseran
- IV. Einfluß der Tierart auf die komplementbindende Aktivität des Antigens
- V. Vergleich zwischen Wärme- und Kältebindung

C Präzipitationsreaktion

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

Einleitung

Die möglichst schnelle Diagnose einer Tollwuterkrankung ist notwendig, um eine sofortige Wutschutzbehandlung bei den gefährdeten Personen einleiten zu können. Die klassischen und bislang auch sichersten Methoden zum Nachweis einer Erkrankung an Tollwut sind der Nachweis von Negri-Körperchen und der Tierversuch. Da diese Methoden aber einerseits keine hundertprozentige Treffsicherheit besitzen und zumindest der Tierversuch längere Zeit in Anspruch nimmt, wurde von vielen Autoren nach anderen Möglichkeiten gesucht; darunter der serologische Nachweis, insbesondere mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion und der Präzipitationsreaktion. In neuerer Zeit wird auch von sehr günstigen Ergebnissen über den Nachweis des Tollwutvirus mit Hilfe fluoreszierender Antikörper berichtet.

Es zeigt sich jedoch, daß bei den serologischen Untersuchungen unspezifische Reaktionen relativ häufig beobachtet werden, was den Wert dieser Methoden in Frage stellen kann. Um die Treffsicherheit zu erhöhen, wird von den verschiedenen Autoren einerseits besonderer Wert auf die Herstellung der Antigene, andererseits auf die Gewinnung der Hyperimmunseren gelegt.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, mit dem Flury-Stamm verschiedene Laboratoriumstierarten zu immunisieren, um auf diesem Wege Hyperimmunseren zu gewinnen. Der Flury-Stamm sollte deshalb verwendet werden, weil seine Kultivierung im Hühnerembryo verhältnismäßig einfach ist, und bei seiner Verwendung die Infektionsgefahr für das Laboratoriumspersonal weitgehend herabgesetzt ist.

Die gewonnenen Hyperimmunseren wurden zur Durchführung der Komplementbindungsreaktion und Präzipitationsreaktion im Agargel herangezogen.

A Vorwort

Die Tollwut ist eine Erkrankung, von der alle Warmblüter betroffen werden können. Als Seuchenreservoir gelten vor allem Wildtiere und hier besonders der Fuchs (SCHOOP 129, 131); in Nordamerika auch Vampire, die andere Wild- und Haustiere und insbesondere den Menschen gefährden. SCHOOP und KAUKEK (130) zeigten für Afrika, daß auf 10 tollwütige Wildtiere

1 tollwütiges Haustier kommt; dasselbe Verhältnis (10 : 1) wies u. a. WACHENDÖRFER (152) für den Raum S-Hessen nach. Von den Haustieren ist nach einer statistischen Zusammenstellung dieses Autors in der Bundesrepublik am häufigsten die Katze betroffen.

Im Folgenden soll nur insoweit auf die Eigenschaften des Tollwutvirus und seiner Züchtbarkeit eingegangen werden, als zum Verständnis der späteren Ausführungen erforderlich ist.

Schon im Altertum wird die Erkrankung beschrieben, aber erst PASTEUR (110) erbrachte in den Jahren 1880-1885 den exakten Nachweis, daß die Tollwut eine Infektionskrankheit ist mit Lieblingslokalisation im ZNS; auch führte er erstmals eine Wutschutzbehandlung beim Menschen durch.

1903 wird eine exaktere Diagnose dieser Erkrankung durch die Entdeckung NEGRI's (101) der nach ihm benannten Einschußkörperchen möglich. REMLINGER (120) wies im gleichen Jahr die Filtrierbarkeit des Virus nach. GALLOWAY und ELFORD (49), YAOI et al. (155) bestimmten ebenfalls durch Ultrafiltration die Größe des Virus mit 100-150 my; während PAIC et al. (109) mit derselben Methode auf 140-210 my kommen. REAGAN et al. (117, 118) und MATSUMOTO (93) konnten diese Größe elektronenmikroskopisch bestätigen (100-120 my); während ROOTS (123) 1962 Zellverdichtungen von 30-70-100 my beschreibt, die seiner Meinung nach das Virus darstellen könnten. Jedoch ist die Morphologie des Tollwutvirus noch kaum bekannt, da es bis heute noch nicht mit Sicherheit gesehen wurde. Auch die Angaben von REAGAN (117, 118), vermögen nach ROOTS (123) nicht ganz zu überzeugen, daß bei vorliegenden Abb. auch wirklich das Virus dargestellt wurde.

Während das Tollwutvirus in gefrorenem Zustand monatelang infektiös bleibt (LEPIN, 86, REMLINGER und BAILLY, 121, GILDEMEISTER, HAAGEN, WALDMANN, 50) wird es durch Hitzeeinwirkung verhältnismäßig schnell inaktiviert: bei + 60 Grad C in 30 Min. (KUWERT, 82), weshalb KUWERT (83) empfiehlt, vor Durchführung der KBR, das Antigen 40 Min. bei + 60 Grad C zu erhitzen, um ein ungefährlicheres Arbeiten zu garantieren; zumal durch diese Inaktivierung die komplementbindende Aktivität nicht beeinträchtigt würde.

Die pH-Stabilität des Tollwutvirus nimmt mit zunehmender H-Ionenkonzentration rasch ab; bei einem pH-Wert von 3,0 erfolgt eine Inaktivierung in 30 Min. (Kuwert, 82).

Verhältnismäßig leicht ist das Straßen-Virus anzuzüchten durch i. c. Inoku-

lation bei den verschiedensten Versuchstieren. Werden hierbei mehrere Tierpassagen durchgeführt, so ändern sich einige Eigenschaften des Virus, und man erhält je nach der Spezies der Versuchstiere die verschiedensten Virus-fixe Stämme; was zuerst von PASTEUR (110) erkannt wurde.

Auch gelingt es, das Virus auf dem bebrüteten Hühnerei anzuzüchten. PERGALLO (11) beschreibt als Erster die erfolgreiche Züchtung von Straßen-Virus über 18 Passagen; 1939 führte die Anzüchtung von Straßen-Virus durch LEACH und JOHNSON (85) zum Flury-Stamm.

KANAZAWA (65), WEBSTER und CLOW (153), BERNKOPF und KLIGLER (7) gelang die erfolgreiche Gewebekulturzüchtung des Tollwut-virus; PLOTZ und REAGAN (114) züchteten das Virus auf Gewebefrag-
menten 10 Tage alter Hühnerembryonen.

Die klassischen Methoden zur Diagnose der Tollwut sind der Nachweis von Negri-Körperchen und die Virusisolation im Tierversuch. Der Nachweis der Ganglienzell-Einschlußkörperchen, die besonders im Ammonshorn zu finden sind (NEGRI, 101, u. a.), ist jedoch nicht bei allen Tollwuterkrankungen zu erbringen. Die Angaben über den Prozentsatz der Treffsicherheit liegen für die einzelnen Tierarten zwischen 62% (PAARMANN, 108) und 96-99% (ERNST, 38). Außerdem werden unspezifische sog. "Pseudokörperchen" beschrieben (BABES, 3, JASTREMSKY, 64, SCHAAF, 124, SEEMANN, 134, u. a.); so findet man beispielsweise bei der Katze LOEWENTHALSCHE (88) bzw. LUZZANISCHE (89) Einschlußkörperchen, welche beide den Negri-Körperchen sehr ähneln können.

Über den Mäusetierversuch gab PITZSCHKE (113) eine zusammenfassende Darstellung. Seit den 30'iger Jahren wird in den USA zum Nachweis des Tollwut-Virus mit Vorteil die weiße Maus verwendet (WEBSTER, 153). SCHOOP (129) wies 1950 im deutschsprachigen Schrifttum als Erster darauf hin, Verf. gibt an, daß in den meisten Fällen um den 12.-16. Tag klinische Erscheinungen auftreten; trotzdem überlebt eine geringe Anzahl von weißen Mäusen immer wieder. (SCHAAF, 124, u. a.). Nach GRIEM (54) sterben nur 75,6% der infizierten Mäuse. Auch Negri-Körperchennachweis bei gleichzeitigem Versagen des Tierversuches wird beschrieben (PITZSCHKE, 113, BINDRICH, 13). Das Versagen des Tierversuches mag neben anderen Ursachen auch abhängig sein von der Spezies der erkrankten Tiere (WACHENDÖRFER, 151).

Aus diesen Angaben ist ersichtlich, daß die beiden klassischen Nachweismethoden verhältnismäßig viele Fehlermöglichkeiten in sich bergen. Ob-

wohl der Nachweis an der weißen Maus immer noch das sicherste Diagnostikum darstellt; jedoch muß einschränkend die Dauer des Versuches berücksichtigt werden.

Serologische Methoden bieten weitere Möglichkeiten zur Feststellung der Tollwut. Die Hämagglutination hat sich mit Ausnahme einer Mitteilung von MECINSKA (96) zur Diagnosestellung der Tollwut bis heute nicht bewährt (NANI, 99, TRUBINA, 143, STARKE und SEIDL, 137, u.a.). Während der Nachweis mit Hilfe fluoreszierender Antikörper nach Überwindung methodischer Schwierigkeiten als verhältnismäßig einfach durchzuführen und vor allem als sehr treffsicher angegeben wird (GOLDWASSER und KISSLING, 51, MC.QUEEN, 94, ETCHEBARNE, 40).

KBR und Präzipitation werden im folgenden gesondert beschrieben.

B Der Flury-Stamm

I. Herkunft

Der Flury-Stamm ist ein Tollwut-Stamm, der seit seiner Isolierung aus menschlichem Gewebe nur in Wirten die Nicht-Säuger sind, gehalten wird (116). Leach und JOHNSON (85) isolierten 1939 aus dem Rückenmark eines in Georgia, USA, an Tollwut verstorbenen Mädchens namens "Flury" das Virus und züchteten es durch i.c. Inokulation bei Eintagskücken an; sie führten 136 Kückenpassagen durch. KOPROWSKI und COX (72) übernahmen Material der 136. Passage, züchteten dieses im Dottersack 7-Tage alter Hühnerembryonen an und führten weitere Passagen in Hühnerembryonen durch.

II. Eikultur und Verhalten des Virus auf dem Hüherei

Der Flury-Stamm ist ein an des Hühnerei adaptierter Tollwut-Stamm. Sind nur wenige Passagen durchgeführt, so spricht man von LEP-Virus (low-egg-passage); von der ca. 180. Passage an von HEP-Virus (high-egg-passage).

Die Passagen werden so ausgeführt, daß befruchtete Hühnereier am 7.-9. Bebrütungstage in den Dottersack infiziert werden (KOPROWSKI, 72, BIN-

DRICH, 12, KUMA, 80, u.a.) Als Injektionsmaterial wird eine 10%ige Emulsion von Embryomaterial verwendet. Da das Virus im Hühnerembryo pantrop wächst (KOPROWSKI und COX, 72, BULLING, 21) könnte man den gesamten Embryo verarbeiten. Jedoch wird am besten Gehirnmateriel verwendet, da hier die Viruskonzentration am höchsten ist (BINDRICH, 12). BULLING (21) konnte den Virusnachweis für den gesamten Embryo und die Chorioallantoismembran erbringen; Dotter und Allantoisflüssigkeit seien nahezu virusfrei. Nach BULLING (21) verliert das Tollwutvirus im Hühnerei seinen neurotrophen Charakter, es wächst also pantrop; diese Eigenschaft geht verloren, sobald das Virus wieder auf Säuger übertragen wird.

Die Hühnereier werden nach der Inokulation im Brutschrank bei 37 Grad C für 9-10 Tage bebrütet. (BINDRICH, 12, KUMA, 80, u.a.). KOPROWSKI und COX (72) wiesen nach, daß die höchste Viruskonzentration im Embryo 9-10 Tage post infectionem vorhanden ist; während bereits vom 4. Tage p.i. an der Embryo sicher infektiös ist (BULLING, 21). BINDRICH (12) gibt den höchsten Virustiter im Embryonengehirn mit dem 8. Tage p.i. an. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Embryonen geerntet und als Passagematerial verarbeitet.

Tötet man die am 7. -11. Bebrütungstag infizierten Hühnerembryonen nicht ab, so sterben sie kurz vor oder während des Schlüpfens (KOPROWSKI und COX, 72, BULLING, 21, BINDRICH, 12). Jedoch kommt eine geringe Anzahl Kücken zum Schlüpfen (21); diese zeigen starke pathologische Veränderungen; ihre Körpermuskulatur ist gequollen und Groß- und Kleinhirn sind atrophiert (21).

Um die Viruskonzentration im bebrüteten Hühnerei zu ermitteln, werden Titrations an verschiedenen Versuchstieren durch i.c. Infektion von infiziertem Embryonen-Material durchgeführt. Im Laufe der zunehmenden Adaptation an den Hühnerembryo fand KOPROWSKI (74) eine Abnahme der Pathogenität für die erwachsene Maus. Während der ersten Passagen betrug die LD $50 \cdot 10^{-4}$ bis $10^{-5,5}$; dieser Virustiter fiel beim Stand der 176. Passage auf $10^{-2,5}$, bei der 178. Passage auf Null. BULLING (21) erzielte mit einem Flury-Stamm, der einige Meerschweinchenpassagen durchgemacht hatte, einen Titer vom 10^{-8} . HUYGELEN und MORTELMANS (62) fanden für die 187. Passage (DEP) einen Titer von $10^{-3,8}$, austitriert an der saugenden Maus.

Der Flury-Stamm wurde von einigen Autoren nicht über Hühnereier weiterpassagiert, sondern durch i.c. Passagen an verschiedene Versuchstiere adap-

tiert, um damit eine Virulenzsteigerung zu erreichen. So adaptierte REM-LINGER (122) ihn z. B. an Meerschweinchen; dieser Stamm wurde von NIKOLITSCH (102) und BINDRICH (12) übernommen. VAN DEN ENDE (37) adaptierte den Stamm an saugende Mäuse (sucklings), wodurch er einen Tieranstieg von 10^{-4} (Eikultur) auf 10^{-8} nach bereits 6 Passagen erzielte.

III. Tierpathogenität

LEACH und JOHNSON (85) passagierten den Flury-Stamm in Eintagskücken; dabei beobachteten sie, daß die Pathogenität dieses Tollwutvirus-Stammes für Kaninchen, Mäuse und Hunde herabgesetzt war. Nachdem KOPROWSKI und COX (72) diesen Stamm in Hühnerei-Passagen fortgeführt hatten, verlor er weiter von seiner Pathogenität. KOPROWSKI zeigte, daß der Stamm von der 40.-50. Hühnerei-Passage (LEP) an bei parenteraler Gabe für die meisten Tiere ungefährlich ist; dieser Wechsel in der Pathogenität unterscheidet den Flury-Stamm von anderen eiadaptierten Stämmen. Das Virus blieb jedoch noch voll infektiös bei direkter Injektion in das ZNS; was an Meerschweinchen, Hamstern und Mäusen nachgewiesen wurde. Mit Material der 75. Hühnerei-Passage i. m. infizierte Kaninchen überlebten regelmäßig ohne Krankheitserscheinungen. Jedoch trat bei i. c. infizierten Kaninchen nach 21-29 Tagen Inkubation Exitus ein. Auch i. m. infizierte Meerschweinchen zeigten nach 10-15 Tagen p. i. Paralysen und starben am 15.-19. Tag p. i. Doch war auch für Meerschweinchen von der 75. Passage an ein Absinken der Pathogenität festzustellen.

Von der 180. Hühnerei-Passage (HEP) an tritt ein völliger Wechsel in der Pathogenität ein. Bei i. m. Gabe ist das Virus vollkommen avirulent gegenüber jeder Spezies und jeden Alters (KOPROWSKI, 73). Nach i. c. Gaben jedoch zeigen Hunde und Kaninchen weiterhin Krankheitserscheinungen. Auch Hamster und Meerschweinchen erkrankten bei höheren Dosen, wogegen sie bei geringeren Dosen keine Erscheinungen zeigten. Bei Mäusen, die älter als 28-35 Tage sind, treten bei i. c. Inokulation keinerlei Veränderungen auf. Allerdings sind saugende Mäuse (sucklings) nach i. c. Inokulation auch weiterhin für das Virus empfänglich. Nacheinigen weiteren Passagen ist das Virus für Kaninchen, Hunde, Meerschweinchen und Hamstern auch bei Applikation in das ZNS nicht mehr pathogen (KOPROWSKI, 73). BINDRICH (17) führt an, daß bei kopfnaher i. m. Applikation und Zufügung von Hyaluronidase zum HEP Flury-Material vorübergehende Erkrankungen auftreten: bei einem Hund trat Exitus ein mit anschließendem Virusnachweis.

IV. Vaccine

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Pathogenität des Flury-Stammes durch die Eipassagen immer weiter abnahm, wurde der Stamm herangezogen, um damit zunächst Tiere gegen das Tollwutvirus zu immunisieren. Hiermit war die Möglichkeit der Vaccination mit einem modifizierten Lebend-Virus gegeben.

KOPROWSKI und BLACK (73) führten mit LEP-Material (37 bis 84. Passage) Immunisierungsversuche an Hunden durch, die sehr gute Ergebnisse hatten. Auch COX (31) führte erfolgreiche Massenimmunisierungen mit eiadaptiertem Flury-Stamm durch. MORTELMANS et al. (98) verwendeten LEP-Material der 40-50. Passage; geben jedoch an, daß Hunde, die jünger als 3 Monate sind, nicht mit LEP-Material geimpft werden dürfen. Andere Autoren beobachteten Zwischenfälle vor allem Paralyse, nach dieser Vaccination; was besonders von REMLINGER (122) hervorgehoben wird. FOLEY (45) beschreibt bei 2081 immunisierten Hunden 21 Erkrankungen mit Paralyse und teilweise Exitus. VAUGHN et al. (146) berichten von einer Katze, die nach der Impfung mit LEP Flury-Stamm starb; das Virus wurde aus der Submaxillaris isoliert und als Vaccine-Stamm erkannt. POTEL (116) verwandte einen LEP Stamm (38. -44. Passage), der vorher zahlreiche Meerschweinchenpassagen durchlief. Nach der Vaccination traten entzündliche Gewebeprozesse im gesamten ZNS auf, die allerdings meistens symptomlos verliefen; mögliche Paralyse usw. bildeten sich überraschenderweise zurück. Ebenfalls erzielte BINDRICH (12) mit einem an Meerschweinchen adaptierten Flury-Stamm gute Ergebnisse. Während in den USA und anderen Ländern Flury-LEP Lebend-Vaccine in großem Umfang zur präinfektionellen Immunisierung von Hunden benutzt wird, ist dies in der Bundesrepublik bisher behördlich untersagt.

Impfungen mit HEP-Material setzen die Gefährlichkeit weiter herab und regen ebenso wie LEP-Material zur Antikörperbildung an. KOPROWSKI (72) zeigte dies bei Schimpansen, Rhesusaffen und Hunden für Material der 194. Passage. HUYGELEN und MORTELMANS (62) bestätigen dies für das Rind; geben aber an, daß Schafe keine Antikörper bilden.

Für die Impfung des Menschen entwickelten die Lederle-Werke eine Flury-HEP Lebend-Vaccine. Diese wird besonders zur Zweitimpfung herangezogen, da nach wiederholten Impfungen nach HEMPT (58) - (die bei uns häufigste Impfmethode) neurologische Komplikationen beobachtet werden (CHRIST et al. 30, HOFF, 59). In der Bundesrepublik jedoch ist die Anwendung von Flury-Impfstoff z. Zt. noch nicht behördlich genehmigt.

V. Nachweis

a) An der saugenden Maus (suckling).

Während KOPROWSKI (72) mit der Anzahl der Eipassagen einen immer weitergehenden Pathogenitätsverlust des Flury-Stammes für Versuchstiere feststellte, konnte er für die saugende Maus nachweisen, daß sich für sie trotz immer höherer Passagenzahl, keinerlei Veränderungen in der Pathogenität nach i. c. Inokulation ergeben.

Diese Tatsache wird zum Nachweis des Flury-Stammes herangezogen. 0,03 ccm einer 10%igen Suspension des zu prüfenden Embryomaterials wird saugenden Mäusen i. c. inokuliert (KOPROWSKI und COX 72, VAN DEN ENDE, 37). Nach 4-6 Tagen zeigen sich Paralysen und kurze Zeit später tritt Exitus ein. Es empfiehlt sich, mehrere Tiere zu verwenden, um unspezifische Todesfälle ausschließen zu können. Dabei kommt es nicht zur Ausbildung von Negri-Körperchen, da die Zeit die zwischen Infektion und Exitus der sucklings liegt, zu kurz ist; was BINDRICH (12) bei verschiedenen Versuchstieren zeigen konnte.

b) Am 1-Tage bebrüteten Hühnerei.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis des Flury-Stammes besteht in der Infektion von 1-Tage bebrüteten Hühnereiern. Das 1-Tage-Ei zeigt für die einzelnen Tollwutstämme sehr unterschiedliche Empfänglichkeit. YOSHINO et al. (156) führen an, daß für ei-infektiöse Stämme das 1-Tage-Ei ein besseres Kulturmedium darstellt, als das 7-Tage-Ei; die Viruskonzentration im 1-Tage-Ei liege höher. Jedoch finden Verff. den HEP Flury-Stamm aus 7-Tage-Hühnerei-Passagen nicht allzu geeignet zum Wachstum in 1-Tage-Eiern. KUMA (80) allerdings gibt das 1-Tage-Ei als einen der empfindlichsten Wirte für den Flury-Stamm an. Er stellte fest, daß dieser Stamm ohne vorherige Passagen im 1-Tage-Ei für dieses genauso pathogen ist, als wenn es bereits zahlreiche Passagen durchlaufen hätte. Dank dieser hohen Pathogenität für das 1-Tage-Ei ist eine erfolgreiche Titration möglich.

Das Testmaterial wird in den zu prüfenden Verdünnungsstufen 1-Tage bebrüteten Hühnereiern in den Dottersack injiziert. Die Eier werden weiter bei 37,8 Grad C im Brutschrank gehalten, täglich durchleuchtet und die LD 50 bestimmt nach REED und MUENCH (119). KUMA (80) erreichte bei einem HEP Flury-Stamm einen Titer von $10^{-4,9}$. YOSHINO et al. (156) testeten am 1-Tage-Ei 3 Straßen-, 3 Kaninchen Virus-fixe-, und 3 Mäuse Virus-fixe-Stämme und erhielten dabei für die einzelnen Stämme sehr unterschied-

liche Ergebnisse; so z. B. für einen HEP Flury-Stamm den beachtlich hohen Titer von $10^{-7,59}$ bis $10^{-7,89}$.

Während Hühnerembryonen, die am 7. Tage infiziert wurden noch teilweise schlüpfen können, sterben die am 1. Tage infizierten Embryonen spätestens bis zum 10. Bebrütungstage ab.

C Komplementbindungsreaktion (KBR) (vgl. Tab. 2)

I. Übersicht, Spezifität

Als erste Autoren versuchten HELLER und TOMARKIN (57) bereits 1907 die KBR zur Tollwutdiagnose heranzuziehen. Dabei traten jedoch zuviele unspezifische Reaktionen auf, um diese Methode in die Routinediagnostik einführen zu können. In den folgenden Jahren führten weitere Autoren (47, 28, 36, 4, 35, 9, 76) die KBR durch mit ebenfalls unbefriedigenden Ergebnissen. 1911 berichten NEDRIGAILOFF und SAWTSCHENKO (100) zum ersten Mal von einer spezifischen Reaktion; was von anderen Autoren bestätigt wird (10, 157, 75, 139, 77-79). Nachfolgende Verff., die diese Versuchsanordnung wiederholten und variierten, geben jedoch wiederum negative und unspezifische Reaktionen an (60, 97, 61, 132, 63, 92, 71, 140).

Nachdem 1941 CASALS und PALACIOS (26) eine Standardmethode zur Gewinnung von Antigen und Hyperimmunserum entwickelt hatten, werden diese Methoden seither von zahlreichen Autoren variiert; alle Verff. kamen daraufhin zu teilweise sehr guten Ergebnissen. Der besseren Übersicht wegen wurden die bisher erschienenen Publikationen über die KBR tabellarisch zusammengestellt (vgl. Tab. 2).

Es wird immer wieder auf die Treffsicherheit der KBR für Tollwut hingewiesen. Neben weitgehender Übereinstimmung von KBR, Tierversuch und histopathologischer Diagnose gibt BULLING (22) als Sicherheit für die KBR an: bei positivem Ausgangsmaterial 98% positive Reaktionen, bei negativem Ausgangsmaterial 91,5% negative Reaktionen, in den restlichen Fällen unspezifische Reaktionen. BINDRICH und KUWERT (13, 14) konnten in kei-

nem serologisch negativen Fall eine Tollwut durch Tierversuch nachweisen. ANDO et al. (2), DEPOUX und MERVEILLE (33) dagegen erhielten eine Diskrepanz in 1/3 der Fälle zwischen serologischer und histopathologischer Diagnose. OSOLINA und ENGLERT (105) geben die Höhe der unspezifischen Reaktionen mit 12 % an. Durch den relativ hohen Anteil unspezifischer Reaktionen wird der Wert der KBR für die praktische Tollwutdiagnostik unseres Erachtens eingeschränkt.

Trotz dieser oben beschriebenen unspezifischen Reaktionen, wird die Spezifität der Tollwut gegenüber anderen neurotrophen Erkrankungen in der KBR hervorgehoben. BULLING (22) untersuchte Gehirne anderer neurotroper Erkrankungen, die alle negative Ergebnisse zeigten. BINDRICH (14) wertete zur Ausschaltung paraimmunologisch bedingter Reaktionen rabizide Serien gegen die Gehirne von an Staupe, Poliomyelitis, Ektromelie und Pseudowut erkrankter Tiere aus; es traten keine Hemmungen der Hämolyse in der KBR auf.

II. Antigenherstellung

a) Ausgangsmaterial

Neben Speicheldrüsenextrakten (100, 157) wird im allgemeinen Gehirnmaterial tollwutkranker Tiere zur Antigenherstellung verwendet. NEDRIGAILLOFF (100) erhielt mit Gehirnmaterial als Antigen keine spezifischen Reaktionen, sondern ausschließlich mit Speicheldrüsenextrakten. Auch kann später BULLING (22) die KBR mit Speicheldrüsenantigen als spezifisch angeben. ANDO et al. (2) und BINDRICH (14) führen an, daß das Mucin des Speichels die KBR durch einen inhibitorischen Effekt störe.

Obwohl das Tollwutvirus im ZNS überall zu finden ist, ist an den Prädislozierungsstellen die Konzentration des Virus am höchsten. Dementsprechend werden von einzelnen Autoren sehr verschiedene Gehirnteile als Ausgangsmaterial benutzt: ANDO et al. verwendeten CORTEX (2); KOSTREWSKI (75) verwendete Rückenmarksextrakte. Während nach BINDRICH (14) die höchste Konzentration des komplementbindenden Antigens in Hirnstamm und Thalamus zu finden ist.

Das Gehirnmaterial ist lange Zeit verwendungsfähig, denn erst bei hochgradiger bakterieller Zersetzung tritt ein antikomplementärer Effekt auf (14).

Neben dem Vorhandensein des Tollwutvirus im ZNS wurde - wenn auch in nur geringer Konzentration - das Virus in anderen Organen nachgewiesen. SCHWEINBURG (133) und SCHINDLER (126) gaben über diese Befunde eine genauere Zusammenstellung.

b) Extraktionsmittel und Aufschließen des Antigenmaterials

Gehirnextrakte wurden in den ersten Jahren als Koktoantigene verwendet (78, 79, 97, 61, 92, 71, 140) oder es wurden wäßrige (4, 9, 76), alkoholische (76) und auch Glyzerinextrakte (77, 78, 79) hergestellt. CA-SALS und PALACIOS (26, 27) behandeln das Gehirnmaterial mit Benzol oder führen eine Aceton-Ätherextraktion durch; diese Methode wird von weiteren Autoren (8, 39, 5, 143, 42) erfolgreich angewandt; ESPANA und HAMMON (39) lyophilisieren das Gehirnmaterial vorher. Jedoch erzielten ANDO et al. (2) mit Lipoidlösungsmitteln keine befriedigenden Ergebnisse; was von FALKE (41) bestätigt wurde.

Andere Autoren unterziehen die Gehirnsuspension einer Wasserbaderwärmung von 1 Stunde bei 40 Grad C (2, 25, 33, 144, 138, 34).

SCHINDLER (125) und BULLING (22) wiesen nach, daß es durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen des Antigens zu einer Steigerung der antigenen Wirksamkeit komme und die KBR um eine Verdünnungsstufe höher anzeige; auch diese Methode wird viel verwandt (96, 143, 14, 22, 87). BULLING (22) gibt an, daß es für die Güte des Antigens gleichgültig sei, ob das Antigen bei - 70 Grad C oder - 15 Grad C eingefroren wird.

HEINIG (56) suspendiert das Gehirnmaterial mit Veronalpuffer im Verhältnis 1 : 9; inaktiviert diese Suspension durch 5-stündiges Wasserbad bei 56 Grad C und zentrifugiert anschließend 15 Min./3500 U. Min.

Die einzelnen Methoden zur Aufschließung des Antigenmaterials mittels Zentrifugieren s. unter e) und unter "S-Antigen".

FALKE und UHLMANN (42) zeigen einen anderen Weg zur Aufschließung des Antigens; nachdem die 10%ige Gehirnsuspension zentrifugiert ist, fällen sie den Überstand mit Ammoniumsulfat und dialysieren das Präcipitat. Damit erzielten sie Titer bis 1 : 256.

c) %igkeit des verwendeten Antigenmaterials

ANDO et al. (2) und andere (25, 33, 34, 138) verwenden eine 40%ige Gehirnsuspension. Dagegen gibt BINDRICH (14) an, daß eine 40%ige Sus-

pension zu dicht für ein genaues Ablesen in der KBR sei und verwendet daher eine 20%ige Suspension; zumal diese geringere Konzentration genauso exakte Ergebnisse ergebe. Andere Autoren bestätigen dies (144, 14, 125, 37, 87). BULLING (22) findet, daß eine 40%ige Suspension zwar höhere Titer ergebe, dafür aber mehr unspezifische Reaktionen auftreten. Er verwendet eine 16,6%ige Suspension, MECINSKA (96) eine 15%ige; andere eine 10%ige (142, 42); BENAZZI und MANTOVANI (6) eine nur 5%ige Gehirnsuspension.

d) Suspensionsmittel

ANDO et al. (2) u. a. verwenden physiologische Kochsalzlösung zur Herstellung der Gehirnsuspension. SCHINDLER (125) gibt an, daß Veronalpuffer das beste Verdünnungsmittel sei.

e) Zentrifugation

Nachdem die Gehirnsuspension hergestellt ist, wird sie zentrifugiert und der Überstand als Antigen zur Durchführung der KBR verwendet :

Für 15 Min.

zentrifugieren bei	2 500 U/Min. (6)
" "	10 000 U/Min. (2, 25, 33, 34, 138)
" "	12 000 U/Min. (142, 145)

Für 30 Min.

zentrifugieren bei	2 000 U/Min. (37)
" "	2 500 U/Min. (96)
" "	3 000 U/Min. (2, 42, 13, 14, 87)
" "	10 000 U/Min. (22)

Für 45 Min.

zentrifugieren bei	3 000 U/Min. (22)
--------------------	-------------------

Für 1 Std.

zentrifugieren bei	15 000-20 000 U/Min. (37)
--------------------	---------------------------

Nach BULLING bedeutet es keinen Unterschied, ob bei 3 000 oder 10 000 U/Min. zentrifugiert wird.

III. Hyperimmunserumgewinnung

a) Versuchstiere

Zur Gewinnung der Hyperimmunseren werden Versuchstiere mit einer Aufschwemmung von virushaltigem Material infiziert. Die am meisten verwendeten Tiere sind Kaninchen. KOLMER und TRIST (70) beschreiben dagegen für das normale Kaninchenserum eine erhebliche unspezifische Bindungsfähigkeit. ANDO et al. (2) versuchten, ein mit einem Minimum an antikomplementären Eigenschaften ausgestattetes Immunserum dadurch zu gewinnen, daß sie anstatt Kaninchen Meerschweinchen verwendeten; doch auch mit diesen Seren konnten unspezifische Reaktionen nicht ausgeschlossen werden. Auch DEPOUX und MERVEILLE (33) u.a. gelang es nicht für Kaninchenserum streng spezifische Reaktionen nachzuweisen.

NEDRIGAILOFF (100) führte die Untersuchungen mit Pferdeserum durch; andere (4, 97, 61, 92, 71, 53, 143) gewannen Hyperimmunseren bei Schafen.

Einige Autoren führten die KBR mit Serum von gegen Tollwut immunisierten Menschen durch (75, 60, 5) und geben teilweise positive Ergebnisse an.

Obwohl nach MACE und CORTEZ (90) Hundeserum immer antikomplementär reagiert, führt BINDRICH (14) an, daß der Hund der beste Hyperimmunserumspender sei, Meerschweinchen und Kaninchen seien ungeeignet.

Auch Mäuse werden verwendet (18, 42, 37). FALKE und UHLMANN (42) versuchten, im Serum moribunder Mäuse komplementbindende und präzipitierende Antikörper nachzuweisen, was jedoch mißlang.

b) Injektionspräparate und Applikationsmodus

Die Art der Herstellung der Injektionspräparate sowie der Injektionsmodus werden von den einzelnen Autoren sehr unterschiedlich gehandhabt. Auf jede einzelne Variationsmöglichkeit kann im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden. KUWERT und BINDRICH (81) bereiten das Injektionsmaterial unter Verwendung von Lipoidlösungsmitteln wie Äther und Chloroform zu, was folgende Vorteile bieten soll: rascher und sicherer Anstieg der virusneutralisierenden Antikörper; Vermeidung unerwünschter Impfreaktionen und schnelle Resorption des spezifischen Antigens; Vermeidung unspezifischer Gehirnantigen-Antikörperreaktionen bei der Serumuntersuchung in der KBR. Bei Verwendung von Serum, das mit ungereinigtem, homologem Antigen gewonnen war, beobachteten Verff. (81) unspezifische Reaktionen.

Auch BINDRICH (14) gibt eine Chloroformreinigung an; zumal der Flury-Stamm nach BINDRICH (11) chloroformresistent ist. Die Chloroform-Reinigung führe zur Einbuße der infektiösen Komponente bei Erhaltung der immunisierenden Eigenschaften. Während FERREIRA und CONTE (44) angeben, daß die Wirksamkeit eines rabiziden Serums mit dem Gehalt des Injektionspräparates an Nervensubstanz ansteige. BULLING (22) zeigte, daß bei chemischer Inaktivierung zwar ein Verlust der Infektiösität eintritt, nicht aber die immunisierenden Fähigkeiten verloren gehen.

FALKE und UHLMANN (42) gewannen ein hochwertiges Hyperimmunserum von Mäusen, indem sie einen hochpathogenen Straßenstamm mit Arlacel A. als Adjuvans injizierten.

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über den Applikationsmodus bei verschiedenen Versuchstieren :

TABELLE 1

Verfasser	Tierart	Art der Applikation	Menge in ml	Anzahl der Injektionen	Injektions-Antigenintervalle	Virus-Stamm
DEPOUX, MERVEILLE (33)	Kaninchen	s. c.	2,0	7 x	2x/Woche 5%ige Phenol-Vaccine	
UEKI et al. (144)	Meerschweinchen	i. p.	2,0	4 x	wöchentlich 10%ige Meerschweinchen-gehirn-Emulsion	Virus-fixe, inaktiviert durch UV- Bestrahlung
BINDRICH (12)	Hund, Kaninchen	i. p. / i. m. ab- wechselnd	20,0 2,0-5,0	10 x	in 6 Wochen 20%ige Meerschweinchen-gehirn-Emulsion. 1 Std. Eisbad, 1/2 Std. zentrifugieren bei 3000 U./Min., Überstand und gleiche Teile Chloroform; 1/4 Std. im Schüttelapparat	Pitman-Moore
BULLING (22)	Kaninchen	s. c. / i. m.	1,0-2,0	beliebig	wöchentlich zuerst abgetötete Vaccine (10% Kaninchengehirn und 0,5% Phenol), dann leben- des Virus	Virus-fixe
VAN DEN ENDE (37)	Maus, Kaninchen	s. c. / i. p., s. c.	0,25 2,0	1 x/5 x 3 x	10 Tage/ 3-4 Tage monatlich S-Antigenmaterial und Adjuvans	An sucklings adaptierter Flury-Stamm

c) Serumgewinnung

Die Serumgewinnung erfolgt bei den verschiedenen Tieren auf die übliche Art, zu dem gewünschten Zeitpunkt. Einige Autoren beschreiben einen Titeranstieg durch Ausnutzung des Booster-Effektes; u. a. stellte HABEL (55) bei Immunisierungsversuchen fest, daß alle Dosen, die nach der 1. bis 3. Infektion appliziert werden, Booster-Effekt haben. Dieser Effekt sei am 10. bis 12. Tage nach der 1. Impfung am größten.

Während der Immunisierung gegen Tollwut, steigt die durchschnittliche Konzentration der Globulinfraction 8 im Serum an (KUWERT, 81, OLECHNO-WITZ, 104). Die beiden Autoren konnten zeigen, daß alle komplementbindenden sowie der größte Teil der neutralisierenden Antikörper in der γ -Globulinfraction lokalisiert sind. Dagegen fanden CHABAUD et al. (29) mittels Papierelektrophorese eine Erhöhung der Alpha²-Globuline bei tollwutinfizierten Hunden. Jedoch wies ALOSI (1) mit der gleichen Methode eine Zunahme der γ -Globuline und eine Abnahme der Albuminfraction bei rabiziden Seren nach. ETCHBARNE et al. (40) fanden den größten Teil der neutralisierenden Antikörper ebenfalls in der Gamma-2-Globulinfraction lokalisiert.

T A B E L L E 2

=====

Übersicht über die vorliegenden Untersuchungen mit Hilfe der KBR ⁺

Autor	Jahr	Ergebnis	Hyperimmun- serum gewon- nen von :	Art des Antigens
HELLER, TOMARKIN (57)	1907	neg. bzw. unspezifi- sche Reak- tion	Kaninchen	Kaninchengehirnemulsion
FRIEDBERGER (47)		neg.	Pferd	
CENTANNI(28)	1908	neg.	Kaninchen	
DONATI, SATTA (36)		neg.	Kaninchen	

BARONI, CIUCA, JO- NESCU-MI- HAI-ESTI (4)	neg.	Kaninchen,	H ₂ O-Extrakte von Virus-fixe Material
DOBROWOLS- 1910 KAJA (35)	neg. bzw. unspezi- fisch	Hund	
BERRY, MANN (9)	neg.	Kaninchen	H ₂ O-Extrakte von Virus-fixe Material und Normalge- hirnen
KOZEWALOFF (76)	neg. bzw. unspezi- fisch	Kaninchen	alkoholische und wäßrige Ex- trakte aus Gehirnen und Leber von Tollwut-Kaninchen
NEDRIGAI- 1911 LOFF, SAWTSCHENKO (100)	pos.	Pferd	Speicheldrüsenextrakte von Menschen und Hunden
BERTAREL- 1913 LI (10), ZELL (157)	pos.	Serum von Straßenvirus infizierten Tieren	Speicheldrüsenextrakte
KOLMER, 1916 TRIST (70)	beschreiben	erhebliche unspezifische Bindungsfähigkeit des Kaninchennormalserums	
KOSTRE- 1920 ZEWSKI (75)	pos.	Serum von Menschen, die gegen Tollwut im- munisiert wurden	Rückenmarksextrakte von mit Virus-fixe infizierten Tieren
TAKAKI, 1926 BONIS, KOREF (139)	pos.		

KRAUS, MICHALKA (77)		pos. bzw. un- spezifische Hemmungen verschwinden spätestens nach 24Std. -Spezifi- sche Hemmun- gen bleiben be- stehen	Kaninchen	Glyzerinextrakte oder Koktoantigen (100 Grad C/30 Min.) von Gehirnen mit Virus-fixe infizier- ter Kaninchen.
KRAUS, TAKAKI (79)		bestätigen die Ergebnisse von KRAUS. MICHALKA		
HOROWITZ- WLASSOWA (60)		kann keine komplementbindenden Antikörper nachweisen - weder bei Menschen nach Pasteur- impfung, noch bei Versuchstieren. Nachweis ge- lingt jedoch bei Kaninchen, die i. v. mit Spei- cheldrüsenextrakt infiziert wurden.		
MICHALKA (97)	1927	neg.	Schaf, Kaninchen	Koktoantigen
HOTTA (61)	1928	neg.	Schaf, Kaninchen	Koktoantigen
SCHULTZ, BULLOCK, BREWER (132)		neg.		
IMIG (63)		unspezifisch	Kaninchen	Kaninchengehirn
MARIE, URBAIN (92)	1929	neg.	Schaf, Kaninchen	Koktoantige
KONDO OBANDA (71)		neg.	Schaf, Kaninchen	Koktoantigen
TANG, CA- STANEDA (140)		neg.	Kaninchen	Kokto- und Glyze- rinantigene
GREVAL (53)	1933	pos.	Hammel	nicht näher angegeben
CASALS, PALACIOS (26)	1941	pos.	Kaninchen, Meerschwein- chen	Benzolbehandlung oder Aceton-Äther- extraktion der Lipoide, anschließend Gefrier- trocknung oder 5mali- ges Einfrieren und Auf- tauen, dann 1Std. zentri- fugieren

BERNKOPF, 1943 pos. NACHTIGAL (8)	Meerschwein- chen	Methode von CASALS in vereinfachter Form
GALLIA (48) 1946 pos.		
ESPANA, 1947 pos. HAMMON (39)	Meerschwein- chen	Mäusegehirne lyophilisiert, extrahiert, wieder in Lösung gebracht (sonst wie CASALS)
KIRK, ECKER 1949 pos. (68)		
MACE, pos. CORTEZ (90)	stellen fest, daß Hundeserum immer antikomplementär reagiert	
BELL, BOER 1950 pos. HAZZ, COX (5)	Patienten- serum	benzolextrahierte Mäusegehirn
BRANDENBURG 1952 pos. (18)	Kaninchen Maus, Mensch	Mäusegehirne
ANDO, ISHII, 1953 pos. IRIZAWA, SHI- MADA, KATO, MURAHAMI (2)	Meerschwein- chen	Hundgehirne, 40%ige Cortexsuspension, 1Std. Wasserbad (40 Grad C) anschließend 15 Min. zentrifugieren
BENAZZI, pos. MANTOVANI (6)	Hund	Mäusegehirn 5%ig
MECINSKA 1954 (96)	Kaninchen	Mäusegehirn 15%ig, 30 Min. zentrifugieren, einfrieren und auftauen
CAPPONI, 1955 zweifelhaft SUREAU (25)	Kaninchen, Meerschweinchen	
DEPOUX, 1956 Spezifität ist MERVEILLE (33) zweifelhaft	Kaninchen	Nur wenig geänderte Methode von Ando et al. Gehirne von Meerschweinchen, Mäusen, Hunden, Affen; Gehirne von Menschen, Kaninchen, Ratten und Mäusen einfrieren und auftauen oder Ätherextraktion

TRUBINA (143)	pos.	Kaninchen, Meerschwein- chen, Schaf	
THOMPSON 1957 (142)		Kaninchen	10%ige Kaninchengehirn- Suspension, 15 Min. zentri- fugiert
FALKE, UHLMANN (42)	pos.	Maus	10%ige Gehirnsuspension mit Ammoniumsulfat behandelt und anschließend dialysiert
UEKI, KATO OISHI, MURAH- MI, SHIMADA (144)	pos.	Meerschweinchen	20%ige Mäusegehirnsuspen- sion, 1Std. Wasserbad (40 Grad C), zentrifugieren
BULLING (22)	pos.	Kaninchen	16, 6%ige Gehirnsuspension von verschiedenen Spezies, einfrieren und auftauen, zentrifugieren
BINDRICH, KUWERT (14)	pos.	Hund	20%ige Gehirnsuspension von verschiedenen Spezies, einfrieren und auftauen, zentrifugieren
SCHINDLER (125)	pos.	Kaninchen, Meer- schweinchen	20%ige Gehirnsuspension von verschiedenen Spezies, ultrazentrifugiert
VAN DEN ENDE POLSON, TURNER (37)	pos.	Kaninchen, Maus	20%ige Mäusegehirnsuspen- sion, Ultrazentrifugation
TAGUCHI, MOTO, URIN (138)	pos.	Methode von Ando et al.	
DEPOUX, ORIO (34)	1958 neg.	Kaninchen	Methode von Ando et al.
LINSERT, TEMPLIN, WALTER (87)	1959 pos.	Hund	20%ige Gehirnsuspension von verschiedenen Spezies, Methode von BINDRICH und KUWERT
PETER (112)	1961 pos.	je- verschiedene, von doch verschiedenen Insti- auch tuten bezogene neg. Er-Seren gebnisse)	16, 6%ige Gehirnsuspension von verschiedenen Spezies, einfrieren und auftauen, zentrifugieren

+) zusammengestellt nach Angaben von BINDRICH (14), PETER (112) und
durch eigene Literaturstudien ergänzt.

D Präzipitationsreaktion

Als Erster versuchte BURMEISTER (23) 1915 die Tollwut mit Hilfe der Präzipitationsreaktion zu diagnostizieren; jedoch mit negativem Ergebnis. Auch LÄSSER (84) und SCHULTZ et al. (132) konnten keine spezifische Reaktion nachweisen. 1946-1948 führten OUDIN (107) und OUCHTERLONY (106) eine neue Methode zur Durchführung der Präzipitationsreaktion im Agargel ein. Damit gelang VILLEMONT und PROVOST (148) und FRAS und GRMOVSEK (46) der spezifische Nachweis des Tollwutantigens. Auch SHARMA (136) gibt positive Ergebnisse an; während VAN DEN ENDE, POLSON und TURNER (37) nicht bei allen verwendeten Hyperimmunseren eine positive Reaktion erhalten; ebenso auch PETER (112). GRASSET und PASCU (52) führen eine Mikro-Präzipitations-Technik zum Nachweis des Tollwutantigens an.

a) Antigengewinnung

BURMEISTER (23) prüfte als Antigen ein Extrakt aus Tollwutgehirnen, das mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und anschließend filtriert wurde. LÄSSER (84) stellte die Antigene als Koktoantigene oder als Glycerin-Alkohol-Ätherextrakte her. VAN DEN ENDE, POLSON und TURNER (37) machten Versuche mit dem löslichen Tollwutantigen. SHARMA (136) verwendete eine 10%-20%ige Suspension der zu untersuchenden Gehirne. FRAS und GRMOVSEK (46) setzten das Antigen unverdünnt an. VILLEMONT und PROVOST (148) weisen darauf hin, daß als Antigen keine Gehirnsuspension, sondern unverdünntes Material aus den verschiedenen Gehirnteilen benutzt werden soll.

Zur Kontrolle wird jeweils Gehirnmaterial gesunder Tiere mitgeführt.

b) Hyperimmunserum-Gewinnung

Die Hyperimmunseren werden von gegen Tollwut immunisierten Tieren gewonnen. LÄSSER (84) verwendete Seren von Kaninchen und Schafen; auch VAN DEN ENDE, POLSON und TURNER (37) prüften Kaninchen-, daneben Mäuse-Hyperimmunseren. SHARMA (136) untersuchte Seren von lebenden, tollwutverdächtigen Tieren. FALKE und UHLMANN (42) konnten im Serum moribunder Mäuse keine präzipitierenden Antikörper nachweisen. FRAS und GRMOVSEK (46) benutzen Hyperimmunseren von Pferden, die mit Virus-fixe Material immunisiert wurden. VILLEMONT und PROVOST (148) verwenden Seren von Pferden und Eseln, die mit einer Phenol-

suspension von Virus-fixe-Kaninchengehirnen immunisiert wurden. Daneben untersuchten sie Eselserum, das Antikörper gegen den Flury-Stamm enthielt. Dieses Anti-Flury-Serum vom Esel wurde ebenfalls von PETER (112) geprüft.

Zur Feststellung unspezifischer Reaktionen werden jeweils Serumkontrollen mitgeführt.

c) Prinzip und Art des Mediums zur Durchführung der Präzipitationsreaktion

Die Durchführung der Präzipitationsreaktion basiert heute auf der Methode von OUDIN (107) oder OUCHTERLONY (106). OUDIN (107) überschichtete in einem Röhrchen ein Agar-Immunserum-Gemisch mit löslichem Antigen; bei spezifischer Reaktion kommt es an der Berührungsstelle zu einer Ringbildung. OUCHTERLONY (106) gießt den Agar in eine Petrischale, stanzt Löcher aus und gibt in diese abwechselnd Antigen und Serum. Durch die Diffusion der beiden Anteile in dem Agarmilieu bilden sich in der Berührungsebene Präzipitationsstreifen aus. WILSON und PRINGLE (154) untersuchten diese Technik eingehend und stellten Versuche über verschiedene Variationsmöglichkeiten an. VAN DEN ENDE, POLSON und TURNER (37) wenden die Methode nach OUDIN (107) in modifizierter Form an. SHARMA (136) führt Versuche sowohl mit der Methode von OUDIN (107) als auch derjenigen von OUCHTERLONY (106) durch. VILLEMONT und PROVOST (148) übernahmen die Methode von OUCHTERLONY modifiziert nach MANSI. Diese Autoren verwenden ein Milieu das aus 15g Agar, 16g NaCl, 0,03g Methylorange und 0,02g Merthiolat auf 1 000 ml Aqua dest. besteht. Das Methylorange, das durch Kongorot 0,012% ersetzt werden kann, erleichtert das Ablesen der Reaktion; während das Merthiolat als Hemmstoff für Bakterienwachstum zugesetzt wird. Auch FRAS und GRMOVSEK (46) benutzen dieses Milieu, fügen jedoch kein Merthiolat hinzu, sondern 50 ml physiologische Kochsalzlösung mit 10%igem Phenolzusatz; der pH-Wert beträgt 6,8. In späteren Versuchen fügten VILLEMONT und PROVOST (150) dem Agarmilieu Methylenblau hinzu. Sie beobachteten, daß das Kadmium, das im Methylenblau enthalten ist, die Präzipitationsreaktion beschleunigt und daß die Linien deutlicher hervortreten.

Nachdem der Agar ausgegossen und erstarrt ist werden Löcher ausgestanzt. SHARMA (136) gibt einen Abstand der einzelnen Löcher von 5 mm; VILLEMONT und PROVOST (148) einen solchen von 6-7 mm; FRAS und GRMOVSEK (46) einen von 4 mm an. Der Durchmesser der zylindrischen Stanzlöcher wird von VILLEMONT und PROVOST (148) mit 7 mm angegeben. Nach

WILSON und PRINGLE (154) wirkt sich der Lochabstand auf das Sichtbarwerden der Präzipitationslinien aus : bei 1,1 cm treten sie nach 48 Stunden, bei 1,3 - 1,6 cm nach 72 Stunden und bei 2,7 cm am 12. Tage in Erscheinung.

VILLEMONT und PROVOST (148) gießen 30 ml des Mediums in eine Petrischale, stanzen ein zentrales Loch aus und um dieses 6 weitere Löcher, die auf einem Kreis von 14 mm Durchmesser liegen. Außerdem führen sie folgende Technik durch : auf 3 divergierenden Geraden werden je 6 Stanzlöcher angebracht. Die auf den beiden äußeren Geraden liegenden Stanzlöcher entfernen sich also zunehmend von den mittleren. Mit dieser Anordnung konnten Verff. zeigen, daß die besten Ergebnisse bei einem Lochabstand von 7 mm gewonnen werden.

VILLEMONT und PROVOST (148, 150) geben in das zentrale Stanzloch Hyperimmunserum und in die peripheren Löcher abwechselnd Tollwutgehirn und Normalgehirn; oder umgekehrt, d.h. das zu untersuchende Gehirnmateriale in das zentrale Loch und in die peripheren Löcher abwechselnd Hyperimmunserum und Normalserum.

Anschließend wird die Petrischale in den Brutschrank (37 Grad C) verbracht; wobei darauf geachtet werden muß, daß die Serumreservoirs regelmäßig nachgefüllt werden. FRAS und GRMOVSEK (46) halten die Platten bei Zimmertemperatur.

d) Ablesen der Reaktion

Nach WILSON und PRINGLE (154) treten die Präzipitationslinien bei Aufbewahrung der Petrischalen bei 30,5 Grad C am 3. Tage, bei Kühlschranktemperatur erstmals am 4. Tage auf. SHARMA (136) konnte die Reaktion nach 36 - 48 Stunden teilweise bereits nach 2 Stunden ablesen. FRAS und GRMOVSEK (46) geben an, daß Präzipitationslinien bei Straßen-Virus nach 24 - 48 Stunden, bei Virus-fixe nach 9 Stunden auftraten; nach 48 Stunden erscheine parallel zu der ersten eine zweite Linie. VILLEMONT stellt fest (150) : nach 48 Stunden treten zwei Präzipitationslinien auf; bei Virus-fixe Kaninchengehirnen 3 Streifen; nach 72 Stunden 4 Streifen, von denen 2 Streifen Normalkaninchengehirn-Antigenstreifen sind, da sie sich als Zeichen der Antigenidentität (OUCHTERLONY 106) mit Präzipitationslinien nicht infizierter Normalkaninchengehirn-Antigene vereinigten.

e) Spezifität der Reaktion

VILLEMONT und PROVOST (150) beobachteten im Falle einer Tollwut nie negative Ergebnisse in der Präzipitationsreaktion. THIERY (141) dagegen erhielt bei 30 geprüften positiven Tieren aus 13 Spezies fast nur negative Ergebnisse. Er gibt an, daß eine spezifische Präzipitationsreaktion nur zu bestimmten Jahreszeiten erfolge: so bildeten infizierte Mäuse z.B. im September und Oktober zwar virulentes aber kein präzipitierendes Antigen. Einen Anstieg der Gamma-2-Globuline (als Träger der Immunkörper) konnte er bei rabiziden Tieren nur im Mai und Juni nachweisen. Diese Untersuchungen wurden in Dakar durchgeführt.

Einige Autoren konnten zeigen, daß nicht das gesamte Antigen mit den Antikörpern des Immunserums präzipitiert. BURTIN (24) wies mit Hilfe radioaktiv markierter Antigene nach, daß 17 - 28 % des Materials nicht reagieren. FEINBERG (43) beobachtete mit derselben Methode einen nicht reagierenden Antigenüberstand von 22 - 42 %.

Nach VILLEMONT und PROVOST (150) ist die Agar-Diffusion möglich und spezifisch sowohl mit frischem oder zersetztem als auch mit glyzerin- oder formolbehandeltem Gehirnmaterial. Verff. berichten von einem Hundehirn, das noch nach einjähriger Lagerung bei -20 Grad C spezifische Präzipitationsreaktion zeigte.

E Infektiöses und komplementbindendes Antigen

Über den Zeitpunkt des Auftretens infektiösen und komplementbindenden Antigens im Gewebe infizierter Tiere berichten UEKI et al. (144) bei Straßenvirus, daß das infektiöse Virus 1 - 3 Tage vor dem komplementbindenden Antigen und 3 - 4 Tage vor Ausbildung der Negri-Körperchen nachweisbar ist. 6 - 10 Tage p.i. erscheine das komplementbindende Antigen, die Negri-Körperchen 7 - 10 Tage p.i., d.h. dann, wenn der Virustiter am höchsten sei. KUWERT (83) stellte fest, daß nach i.c. Applikation das Tollwut-Virus nach 1/2, 30, 40 oder 50 Std. (abhängig vom Stamm und der Konzentration) nicht mehr nachweisbar ist. In dieser Latenzphase können weder infektiöses noch komplementbindendes Antigen nachgewiesen werden. Sobald die Tiere Krankheits-Symptome zeigen, erhöht sich der komplementbindende Titer weiter, während der Virustiter sinkt. Im Ver-

laufe der Injektion steigen infektiöses und komplementbindendes Antigen gleichzeitig an.

SCHINDLER (128) gibt an, daß 15 Std. p. i. noch Spuren des Virus nachweisbar sind. Dann tritt ein 32-stündiges virusfreies Intervall ein. Anschließend steigt der Virusgehalt stark an, das komplementbindende Antigen jedoch nur gering. Diese Tatsache erklärt SCHINDLER damit, daß nach einer Tollwutinfektion Viruspartikel bestehen, die zwar das KBR-Antigen besitzen, jedoch nur gering infektiös sind. Dann erst würden die nicht infektiösen Einheiten zu infektiösen Viruspartikeln vervollständigt. Eine ähnliche Hypothese stellt VILLEMONT (149) auf; s. auch unter "S-Antigen".

SCHINDLER (128) zeigte in Experimenten bei Mäusen, daß kurz nach i. c. Injektion das Tollwutvirus sich mit den Zellen des ZNS verbindet und später in diese eindringt, was für Muskelzellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Die KBR wird dann positiv, wenn in 1 g Hirngewebe mindestens 31 250 LD₅₀ für Mäuse enthalten sind (SCHINDLER, 128). UEKI et al. (144) geben an, daß die komplementbindende Wirkung des Antigens bei einem Infektiositätstiter von $10^{-2,4}$ bis $10^{-3,8}$ per 0,03 ml bei Mäusen auftritt, während Negri-Körperchen erst bei einem Titer von $10^{-3,4}$ bis $10^{-5,5}$ erscheinen. Der Titer des komplementbindenden Antigens liegt bei Virus-fixe höher, als bei Straßenvirus (14). KUWERT (83) gibt für die Sensibilitätsschwelle der Tollwut-KBR ca. 100 LD₅₀/0,03 ml Infektionsdosis an.

F Lösliches Antigen (S-Antigen) - (soluble antigen)

Zentrifugiert man eine Tollwutgehirn-Suspension hochtourig, so stellt man fest, daß der Überstand zwar das Komplement bindet, aber einen nur geringen Infektiositätstiter besitzt; während im Sediment ein hoher Infektiositätstiter, aber ein nur geringes komplementbindendes Vermögen nachzuweisen sind (115, 67, 37, 41, 147). Es zeigte sich, daß das Tollwutantigen aus zwei Fraktionen - einem S- und einem V-Antigen besteht.

POLSON und WESSELS (115) geben die Größe des S-Antigenpartikels mit 12 my an. Sie gewannen diese nichtinfektiösen Partikel durch hochtouriges Zentrifugieren und konnten zeigen, daß die infektiösen Teile ein sehr geringes komplementbindendes Vermögen besitzen. Auch KIPPS et al. (67)

erhielten das S-Antigen durch Zentrifugieren (30 000 U/110 Min.). Sie behandelten das S-Antigen mit 0,5%igem Phenol, gaben ein Adjuvans hinzu und konnten auf diese Weise bei Versuchstieren neutralisierende und komplementbindende Antikörper erzeugen.

VAN DEN ENDE (37) erzielte eine hohe Konzentration von S-Antigen durch Adaptation des Flury-Stammes an saugende Mäuse. Er gewinnt dieses durch Zentrifugieren, (20 000/Min.) Dialysieren gegen Zitratpuffer und erneutes Zentrifugieren. Auch erhält er komplementbindendes Antigen durch Kochsalzextraktion von Gehirnen, die zuerst mit Azeton und Äther behandelt waren (Methode nach CASALS, 27). Dabei stellte er fest, daß wiederholte Ätherextraktionen einen deutlichen Verlust von S-Antigen bedingen; während wiederholte Extraktionen in Phosphatpuffer (pH 8, 2) mit Chloroform einen kompletten Verlust des S-Antigens ergeben. Die schweren Partikel, die die Infektiosität des Virus tragen, können nach VAN DEN ENDE (37) vom S-Antigen abgetrennt werden durch: Aufnahme in Phosphatpuffer und Chloroformbehandlung, Einfrieren und Auftauen sowie durch Ultraschallbehandlung.

BINDRICH erzielte durch Einfrieren und Auftauen einen Anstieg des komplementbindenden Titers.

SCHINDLER (128) wies in einer Tollwutgehirn-Suspension nach 60 Minuten Zentrifugieren bei 30 000 U./Min. 0,03 % infektiöse Einheiten im Überstand nach, während die serologische Aktivität noch voll erhalten war; nach weiteren 60 Min. Zentrifugieren sedimentierte auch der nichtinfektiöse Teil. Während der Inkubationszeit träte ein schnell und ein langsam sedimentierendes KBR-Antigen auf.

MEAD (95) reinigte die komplementbindende Komponente durch Präzipitation, Lösung, Adsorption, Chromatographie und Elektrophorese. Er stellte fest, daß die Antigene in der Elektrophorese, in der Chromatographie und im Agar nur ganz gering differieren.

Das S-Antigen widersteht einer Temperatur von 56 Grad C/30 Min. (VAN DEN ENDE, 37); wird bei 60 Grad C/20 Min. inaktiviert (FALKE, 41); wird nach VAN DEN ENDE (37) bei 65 Grad C/30 Min. nur teilweise und bei 80 Grad C/30 Min. vollkommen inaktiviert. Bei +4 Grad C ist nach 14 Tagen ein Aktivitätsverlust von 25% nachweisbar; während es bei -20 Grad C mindestens 4 Wochen haltbar ist. (VAN DEN ENDE, POLSON, TURNER, 37 und FALKE, 41).

Von 0,35 % Formaldehyd, 0,5 % Phenol oder 1/10 000 Merthiolat wird das S-Antigen nur unwesentlich beeinflusst (37).

Die H-Ionen Konzentration wirkt sich wie folgt aus : das S-Antigen ist stabil bei einem pH-Wert von 6,0 - 10,0 (37, 41). Es präzipitiert bei pH 4,3 (37).

Fermente wie Trypsin (MEAD, 95), Ribonuklease, und Desoxyribonuklease reduzieren bei einer Inkubationszeit von 1 - 4 Std. die komplementbindende Kraft des Antigens um $1/2$ - $2/3$ (VAN DEN ENDE, POLSON, TURNER, 37).

VILLEMONT und PROVOST (149) führen an, daß das Tollwut-Virus aus einem korpuskulären Anteil - der je nach Virusstamm verschieden groß ist - und einem gemeinsamen Faktor der Virusgruppe (dem S-Antigen) besteht. Dieses an ein Protein gebundene S-Antigen ist nicht fest an das Virus verankert, so daß es verhältnismäßig leicht davon zu lösen ist. Die Tatsache, daß 2 spezifische Präzipitationslinien entstehen, berechtige zu der Annahme, daß das S-Antigen aus 2 Fraktionen bestehe : einem größeren thermolabilen Teil (der die Bildung neutralisierender Antikörper anregt) und einem kleineren thermostabilen Teil (der die Bildung komplementbindender Antikörper anregt). Verff. stellen die Hypothese auf, daß das S-Antigen ein Stadium in der Synthese des Virus darstelle; d. h. im Anfangsstadium bilde es neutralisierende Antikörper, im Endstadium sei es mit dem infektiösen Partikel identisch.

Zusammenfassend sei noch einmal darauf hingewiesen, daß das S-Antigen der Hauptträger der komplementbindenden Kraft ist; weshalb für die praktische Durchführung der KBR dieses in möglichst hoher Konzentration vorliegen sollte. Die verschiedenen bisher bekannten Möglichkeiten zur Gewinnung und Reinigung von S-Antigen wurden aufgezeigt. Besonders sei betont, daß das S-Antigen eine größere Hitzestabilität als das infektiöse Antigen besitzt; was bei Durchführung der KBR insofern von Nutzen sein kann, als ein weitgehend ungefährliches Arbeiten mit Tollwutantigen durch Hitzeinaktivierung (bei Erhaltenbleiben der komplementbindenden Kraft) erreicht werden kann (KUWERT und LIEPENOW, 82, HEINIG, 56, u. a.).

EIGENE VERSUCHE

Material und Technik

A Der Flury-Stamm

I. Züchtung des Flury-Stammes im bebrüteten Hühnerei

Es wurde nach Angabe von KOPROWSKI, COX (72), BINDRICH (12) u. a. verfahren, die für die Züchtung des Flury-Stammes befruchtete, ca. 7 - 8 Tage bei 37,8 Grad C vorbebrütete Hühnereier verwenden. Bei diesen wird unter der Schierlampe der Dottersack angezeichnet, worauf sie für 1/2 bis 1 Std. senkrecht aufgestellt werden (die Luftkammer muß dabei nach oben zeigen), um ein Absinken des Dottersackes und richtiges Einstellen des Embryo zu erreichen. Die Infektion erfolgte in einer abgeschlossenen Kabine mit Quarzlampe, um möglichst steriles Arbeiten zu erreichen.

Die Hühnereier wurden, nachdem sie mit Spiritus abgeflammt waren, mit einem ausgeglühten Stichel am stumpfen Pol perforiert. In dieses Loch wurde eine Kanüle (Nr. 16, ca. 2,5 cm lang), die auf einer gewöhnlichen Rekordspritze aufgesetzt war in ihrer ganzen Länge senkrecht eingeführt und damit das Injektionsmaterial in den Dottersack eingebracht. Nach der Injektion wurde dieses Loch mit Paraffin versiegelt, und die Eier wurden weiter bebrütet.

Nach 7 - 9tägiger Bebrütung der infizierten Eier ist die höchste Konzentration des Flury-Stammes erreicht (12, 21, 72). Die Eier werden abgetötet (sie wurden für einige Stunden in den Kühlschrank gebracht), wonach die Embryonen geerntet werden können. Der Flury-Stamm wächst im Hühnerei zwar pantrop, jedoch ist seine Konzentration im Gehirn des Embryos am größten. Deshalb wurde ausschließlich dieses geerntet und zur weiteren Passage benutzt.

Entlang der Luftkammergrenze wird der stumpfe Pol nach Abflammen mit Spiritus mit einer Schere abgetrennt. Nach Entfernung der Schalenhaut und der Chorionallantoismembran bzw. nach Eröffnung der Amnionhöhle faßt man mit einer Pinzette den Kopf des Embryos, trennt ihn mit der Schere vom Rumpf ab und bringt ihn auf eine sterile Petrischale, wo man das Gehirn freipräparieren kann.

Die geernteten Gehirne wurden in einem Gewebemörser zerkleinert, das homogene Material verdünnt und zur weiteren Passage verwendet.

Es wurden pro Ei 0,2 - 0,3 ml des Passagematerials in einer Verdünnung von 1 : 3 - 1 : 4 injiziert. Das Verdünnungsmedium bestand aus 10%iger Kochsalzbouillon (10 % Fleischbouillon in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,2). Pro ml wurden 1 000 IE Penicillin und 25 mg Streptomycin zugegeben. Das Injektionsmaterial stand vor der Passagierung für 1/2 Std. bei Zimmertemperatur, um den Antibiotikazusatz einwirken zu lassen.

Nach der Infektion wurden die Hühnereier täglich 2 mal durchleuchtet, um interkurrentes Absterben erfassen zu können. Das Absterben der Embryonen bis zum 5. Tag p.i. galt als unspezifisch. Von den 10 pro Passage infizierten Hühnereiern starben im Durchschnitt 1 - 3 Stück unspezifisch ab.

Sowohl das geerntete Eimaterial, als auch die interkurrent gestorbenen Hühnereier sowie das für die Passagen verwendete Material wurden regelmäßig einer bakteriologischen Kontrolle (aerob und anaerob) unterworfen.

Als Ausgangsmaterial für die Eipassagen dienten :

a) Ein aus der 189. Passage des LEP-Lederle-Impfstoffes für Hunde herausgezüchtetes Virus, das das Bundesgesundheitsamt in Berlin-Dahlem dankenswerterweise zur Verfügung stellte ⁺⁾ . Das Material wurde in lyophilisiertem Zustand übernommen, angezüchtet und somit im hiesigen Institut mit der 190. Passage kultiviert; also insgesamt über 15 Passagen geführt. Die ersten 5 Passagen dienten dazu, das Virus auf dem Ei anzuzüchten. Nachdem das Virus nachgewiesen war (s. "Nachweis"), dienten die weiteren Passagen dazu, Material für die Immunisierung der Tiere zu gewinnen. In der 203. Passage starben 6 Hühnereier infolge einer Verunreinigung mit Hefen ab. Um die Hefen aus dem Material zu entfernen, wurde dieses filtriert (EK-Scheiben der Fa. Seitz, Kreuznach), wonach keine Verunreinigung mehr nachweisbar war. Dieses Filtrat wurde saugenden Mäusen i. c. appliziert; und zur 204. Passage verwendet.

b) Ein LEP-Flury-Stamm, den die WHO in Genf freundlicherweise überließ ⁺⁾ . Wir erhielten lyophilisiertes Material der 70. Passage, züchteten es auf 7 Tage bebrüteten Hühnereiern an, führten es über insgesamt 3 Passagen und verfahren im übrigen genauso wie oben beschrieben. Nachdem der Virusnachweis für das Material der 72. Passage erbracht war, wurde dieses zur Immunisierung der Tiere (Booster-Injektion) herangezogen.

⁺⁾ Für die Überlassung der beiden Stämme sei Herrn Prof. Dr. Zunker, Berlin und Herrn Dr. Kaplan, Genf nochmals gedankt.

TABELLE 3

Verwendung des Embryogehirnmaterials der einzelnen Hühnereipassagen :

Passagen Nr.	HEP-Stamm	
190 Anzüchtung des Flury-Stammes	194 Titration am 3-Tage-Ei	Pathogenitätstest an der saugenden Maus
191 im bebrüteten Hühnerei		
192		
193	195 Pathogenitätstest an der saugenden Maus	
196 Ausgangsmaterial für acht Injektionen von	203 Filtration	Pathogenitätstest an der saugenden Maus
197		
198 8 Meerschweinchen	204 Nachweis am 3-Tage-Ei	
199 5 Kaninchen		
200 4 Hühnern		
201		
202		
71 Anzüchtung	LEP-Stamm	
	72 Pathogenitätstest an der saugenden Maus	Ausgangsmaterial für die Booster-Injektion
	73	

II. Nachweis

a) An der saugenden Maus beobachteten KOPROWSKI und COX (72), daß der Flury-Stamm von der 182. Passage an bei i. c. Inokulation für kein Tier - die saugende Maus ausgenommen - pathogen ist. Diese Tatsache wird zum Nachweis des Virus herangezogen.

Das zu prüfende Embryogehirnmaterial wurde zermörsert, verdünnt 1 : 10 mit 10 %iger NaCl-Bouillon und Antibiotikazusatz (vgl. S. 35) und 0,01 - 0,02 ml dieser Suspension jeder saugenden Maus i. c. appliziert, wobei jede Versuchsgruppe aus je 5 saugenden Mäusen im Alter von ca. 12 Tagen bestand. Der Virusnachweis erfolgte für : - (vgl. Tab. 3) -

- 1.) Embryogehirnsuspension der Titrationsreihe am 3-Tage-Ei (Ausgangsmaterial für die Titration war die 194. Passage) HEP
- 2.) Embryogehirnsuspension der 195. Passage HEP
- 3.) Keimfrei filtriertes Material der 203. Passage HEP jeweils 2 Versuchsgruppen
- 4.) Embryogehirnsuspension der 72. Passage LEP

Das durch die i. c. -Inokulation gesetzte Trauma hatte nie einen Einfluß auf die saugenden Mäuse; so hätte eine unspezifische Todesursache höchstens bedingt sein können durch

- 1.) Das i. c. Verabfolgen von embryonalem Hühereiweiß oder von Penicillin, Streptomycin oder NaCl-Bouillon. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurden 2 Gruppen zu je 5 saugenden Mäusen i. c. inokuliert mit "normalem" embryonalem Hühnereiweiß (ebenfalls von 15 Tage alten Hühnerembryogehirnen gewonnen), das mit demselben Verdünnungsmedium wie oben angegeben, aufbereitet war.
- 2.) Eine bakterielle Meningitis der saugenden Mäuse, hervorgerufen durch bakterielle Verunreinigung des Ausgangsmaterials. Diese Möglichkeit konnte durch kulturelle (aerobe und anaerobe) Untersuchungen des Ausgangsmaterials sowie der Mäusegehirne post mortem geprüft werden.

b) Am 3-Tage bebrüteten Hühnerei

KUMA (80), YOSHINO et al. (156), VAN DEN ENDE (37) zeigten, daß das 1-Tage bebrütete Hühnerei ein sehr empfindlicher Wirt für das HEP Virus ist. In eigenen Versuchen wurden jedoch 3 Tage vorbebrütete Eier verwendet, da man bei diesen leichter erkennen kann, ob sie befruchtet sind; womit eine Infektion unbefruchteter Hühnereier vermieden werden kann.

Dieser Test am 3-Tage-Ei diente sowohl zum Nachweis des Flury-Stammes, als auch zur Titration.

Nachdem mit Hilfe der Schierlampe die 3-Tage-Eier als befruchtet erkannt waren, wurden je Verdünnungsstufe 4 3-Tage-Eier infiziert. Die Verarbeitung des auf seinen Virusgehalt zu prüfenden Materials der 194. Passage erfolgte in der oben beschriebenen Art; wobei folgende Verdünnungen injiziert wurden : 1:10, 1:30, 1:300, 1:3 000.

Zusätzlich wurden von den vom 6. Tag p.i. an abgestorbenen Embryonen einzelne Gehirne in der oben angegebenen Art aufbereitet und im Versuch an der saugenden Maus getestet.

Außerdem diente der 3-Tage-Ei-Test dazu, Material der 204. Passage (ausgeführt mit filtriertem Material der 203. Passage) auf seinen Virusgehalt zu prüfen.

B Gewinnung der Seren

I. Gewinnung der Flury-Antiseren

a) Immunisierungsmaterial

Das zur Immunisierung der Tiere verwendete Gehirnmaterial stammte aus den Passagen Nr. 195 - 202. Nach dem Ernten der Hühnerembryonen (s. oben) wurde das Gehirn in einem Gewebemörser zu einer homogenen Masse verarbeitet und mit 10 %iger NaCl-Bouillon (10 % Fleischbouillon in physiologischer Kochsalzlösung, pH 7, 2) eine Verdünnung von 1 : 10 hergestellt. Diese Suspension wurde 10 - 15 Min. bei 3 000 U./Min. zentrifugiert und der Überstand als Antigen verwendet.

b) Versuchstiere

Als Serumspender dienten folgende Tiere :

- 8 Meerschweinchen
- 5 Kaninchen
- 4 Hühner

c) Injektionsmodus

Die i. a. injizierte Dosis an virushaltigem Material betrug für Kaninchen und Hühner 1,0 ml und für Meerschweinchen in der Regel 0,7 ml pro Tier. Der Abstand zwischen den einzelnen Injektionen betrug 6 bis 8 Tage. Nach der 7. Injektion (Meerschweinchen und Hühner) bzw. nach der 8. Injektion (Kaninchen) wurde das HEP-Material abgesetzt und nach 5-monatiger Pause eine Booster-Infektion mit dem LEP-Stamm gesetzt. Blutproben wurden entnommen :

In Verbindung mit der 1. Injektion	(bei allen Tieren)
" " " 3. "	(bei Kaninchen und Hühnern)
" " " 4. "	(bei Meerschweinchen)
" " " 5. "	(bei Kaninchen und Hühnern)
" " " 6. "	(bei Meerschweinchen)
5 Monate nach der 7. "	(bei Meerschweinchen und Hühnern)
5 " " 8. "	(bei Kaninchen)
14 Tage nach der Booster-Injektion	(bei allen Tieren)

Die Immunisierungsversuche liefen insgesamt über 7 1/2 Monate.

d) Serumgewinnung

Das Blut konnte bei den Hühnern aus der Flügelvene mit der Impflanzette gewonnen werden; bei den Kaninchen aus der Ohrvene mit einer auf eine Rekordspritze aufgesetzten Kanüle; und bei den Meerschweinchen durch Herzpunktion. Bei dieser Herzpunktion kam 1 Meerschweinchen ad Exitum durch anschließende innere Verblutung. Außerdem starben gegen Versuchs-ende ein Teil der Meerschweinchen an Pneumokokkensepsis mit teilweise abszedierender Pneumonie.

Nachdem das Blut gewonnen war, wurde es über Nacht bei Zimmertemperatur gehalten, am nächsten Tag zentrifugiert und so das Serum für KBR und Präzipitationsreaktion gewonnen. Nicht sofort geprüfte Seren wurden in der Kühltruhe bei -20 Grad C aufbewahrt.

II. Positive Vergleichsseren

Neben den in eigenen Versuchen gewonnenen Immunsereen stellte das Institut für Zoonosenforschung in Frankfurt/M. freundlicherweise ein rabizides Kaninchenserum und ein rabizides Meerschweinchenserum für Vergleichsuntersuchungen zur Verfügung.

III. Gewinnung der Kontrollseren

Zur Kontrolle wurden folgende Seren in die Untersuchung einbezogen :

- 1a) Von den in den eigenen Versuchen verwendeten Tieren vor Immunisierungsbeginn gewonnene Seren.
- b) Rindernormalseren
- c) Pferdenormalseren
- 2d) Um unspezifische Reaktionen, die auf Antikörperbildung beruhen könnten, ausschließen zu können, wurden 4 Meerschweinchen, 2 Kaninchen und 2 Hühner in gleichem Applikationsmodus wie oben beschrieben Gehirnmaterial nicht infizierter Hühnerembryonen (15 Tage alt) injiziert und in gleichen Zeitabständen Blutproben entnommen (Anti-Embryogehirn-Seren).
- e) Seren von 7 Kaninchen und 4 Meerschweinchen, die gegen virushaltiges, embryonales Eimaterial (Schafabort- bzw. Ornithosevirus) sensibilisiert waren (S-Seren).

C Antigenherstellung

I. Zur KBR

Als Antigen diente Gehirnmaterial von auf Tollwut zu untersuchenden an das Institut für Zoonosenforschung eingesandten Tieren. Die Tiere galten dann als infiziert, wenn der Nachweis von Negri-Körperchen bzw. der Tierversuch positiv ausfielen (virushaltige Antigene).

Daneben wurden zur Kontrolle Gehirne gesunder Tiere zu Antigen auf die gleiche Weise verarbeitet (nicht virushaltige Antigene).

Das zu prüfende Gehirnmaterial (Gehirnstamm) wurde mit Seesand im Mörtel zerrieben; von dieser homogenen Masse wurden eine 20 %ige bzw. eine 40 %ige Suspension mit Veronalpuffer (pH 7,4) nach KLÖNE (69) hergestellt, um die Wirkung der Dichte in der KBR zu prüfen. Diese Suspension wurde durch einige Lagen Gaze geliefert, um gröbere Teile zu entfernen und anschließend 20 Min. bei 3 000 U./Min. zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und der Überstand als Antigen verwendet.

Die eingesandten Gehirne wurden entweder in frischem Zustand verarbeitet, oder bei -20 Grad C aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt aufbereitet.

Insgesamt wurden 10 virushaltige (durch Nachweis von Negri-Körperchen bzw. durch Tierversuch bestätigt) und 6 nicht-virushaltige Gehirne untersucht.

II. Zur Präzipitationsreaktion

Die in der Präzipitationsreaktion geprüften Antigene wurden ebenfalls von Gehirnen tollwütiger Tiere (bestätigt durch den Nachweis von Negri-Körperchen bzw. durch Tierversuch) und als Kontrolle von gesunden Tieren gewonnen. Dieses Gehirnmaterial wurde jedoch nicht in der gleichen Weise wie zur KBR aufbereitet, sondern kleine Teile aus den verschiedensten Hirngebieten in unbearbeitetem Zustand verwendet. Auch hier wieder wurde das Material teils in frischem Zustand, teils nach Aufbewahren bei -20 Grad C geprüft.

D Komplementbindungsreaktion (KBR)

I. Vorversuch

Zur KBR wurden verwendet :

Eine 3 %ige Suspension von 3 mal gewaschenen Hammelerythrocyten in physiologischer Kochsalzlösung.

Ein von den Behringwerken, Marburg bezogener hämolytischer Ambozeptor.

Ein von den Behringwerken, Marburg bezogenes Meerschweinchen-Komplement.

Die zu prüfenden Antigene. - Die oben angegebenen Seren.

Das hämolytische System bestand aus dem mit physiologischer Kochsalzlösung 1:3 000 verdünnten Ambozeptor und der 3 %igen Hammelblutkörperchen-Suspension; beide zu gleichen Teilen gemischt. Die Auswertung der Komplementmenge erfolgte in der üblichen Form; wobei diejenige Komplementmenge, die gerade noch komplette Hämolyse ergab als eine Komplement-

einheit berechnet wurde. Die volle Komplementeinheit war die nächste um 0,05 ml höhere Komplementmenge (1:37,5). Im Hauptversuch wurden 2 volle Komplementeinheiten, die in 0,5 ml enthalten sein mußten, verwendet.

Als Verdünnungsmedium diente bei der Durchführung der KBR grundsätzlich ungeschüttelte physiologische Kochsalzlösung.

II. Hauptversuch

Vor Versuchsbeginn wurden die zu untersuchenden Seren für 1 Stunde bei 56 Grad C im Wasserbad inaktiviert; bei wiederholten Untersuchungen für 1/2 Stunde bei 56 Grad C nachinaktiviert. Danach wurden fortlaufende Verdünnungen dieser Seren mit dem Verdünnungsfaktor 2 hergestellt, beginnend bei einer Verdünnung 1 : 5. Die Verdünnungen wurden in 1/4-Dosen überpipettiert. Dann wurde das Antigen in 1/4-Dosen zugegeben; und anschließend 0,5 ml des im Vorversuch autitrierten Komplements. Dieses Serum-Antigen-Komplement-Gemisch wurde gut durchgeschüttelt und für 1 Stunde in ein Wasserbad von 37 Grad C gegeben. Danach wurde das hämolytische System (Ambozeptor 1:3 000 und Hammelerythrocyten 1:1) in einer Menge von 0,5 ml in jedes Röhrchen einpipettiert. Nachdem das II. System zugegeben war, verblieben die Röhrchen noch 20 - 30 Min. im Wasserbad von 37 Grad C. Anschließend wurde das Ergebnis abgelesen; dabei galt :

Vollständige Hemmung :	++++
75 %ige	"
50 %ige	"
25 %ige	"
Vollständige Lysis :	Ø

Neben der oben beschriebenen Wärmebindung wurde die Kältebindung, wie sie bereits von einigen Autoren (2, 143 u. a.) für die Tollwutdiagnose herangezogen wurde, durchgeführt. Es wird angegeben, daß damit bessere Resultate und höhere Titer zu erreichen seien. Die Kältebindung wurde grundsätzlich genauso angesetzt wie die Wärmebindung. Jedoch wurden die Röhrchen, nachdem das I. System gut durchgeschüttelt war, für 20 Stunden in den Kühlschrank (+ 4 Grad C) gebracht. Danach wurde das II. System zugegeben und die Röhrchen bis zu einer Stunde im Wasserbad von 37 Grad C gehalten.

Grundsätzlich lief bei jedem Versuch für jedes Serum eine Kontrolle mit

(statt Antigen bzw. Komplement wurde zum Serum physiologische Kochsalzlösung gegeben). Ebenso wurde für jedes Antigen eine Antigenkontrolle mitgeführt (Antigen und physiologische Kochsalzlösung anstelle des Serums + hämolytisches System.)

E Präzipitationsreaktion

Die Präzipitationsreaktion im Agargel wurde in Anlehnung an die von VILLEMONT und PROVOST (147) angegebene Methode durchgeführt. Das Agarmilieu bestand aus 15 g Agar, 16 g NaCl, 0,03 g Methylorange und 0,02 g Merthiolat auf 1 000 ml Aqua dest. Dieses Milieu wurde so in Petrischalen ausgegossen, daß der Boden ca. 3 - 5 mm bedeckt war. Nach dem Erkalten wurden mit Hilfe einer Schablone Löcher ausgestanzt. Die Löcher, die das Antigen aufnahmen, hatten einen Durchmesser von 8 mm; diejenigen, die das Serum aufnahmen, einen solchen von 5 mm. Der Abstand der einzelnen Löcher betrug 7 mm. Nachdem Antigen- und Serumreservoir aufgefüllt waren, kamen die Platten in den Brutschrank (37 Grad), wo sie für 6 - 7 Tage verblieben; danach wurden sie noch einige Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt und beobachtet. Es wurde darauf geachtet, daß die Serumreservoirs regelmäßig nachgefüllt wurden.

Zum Ablesen der Reaktion wurden die Platten im schräg auffallenden Licht gegen einen dunklen Hintergrund betrachtet.

ERGEBNISSE

A Der Flury-Stamm

I. Eikultur

Der HEP-Stamm wurde über insgesamt 15 Eipassagen geführt. Dabei konnte der Flury-Stamm am 3-Tage vorbebrüteten Hühnerei nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde gleichzeitig als Titrationsversuch ausgeführt, im Ge-

gensatz zu der von KUMA (80) und YOSHINO (156) angewandten Methode der Infektion 1-Tage vorbebrüteter Hühnereier. Die Titration erfolgte bis zu einer Verdünnung von 1 : 3 000. Um ein unspezifisches Absterben der infizierten 3-Tage-Eier ausschließen zu können, wurde aus jeder Verdünnungsstufe ein Embryonengehirn geerntet, in der üblichen Art verarbeitet und damit ein Pathogenitätstest an saugenden Mäusen ausgeführt; da alle Tiere ad Exitum kamen, war das Absterben der 3-Tage-Eier als spezifisch anzusehen.

Als weiterer Beweis für das Vorhandensein des Flury-Stammes in der Eikultur wurde mit Material der 195. Passage ein Pathogenitätstest an der saugenden Maus ausgeführt, der ebenfalls positiv ausfiel.

Nachdem das mit Hefen verunreinigte Material der 203. Passage keimfrei filtriert war, konnten nach i. c. Infektion bei saugenden Mäusen keine spezifischen Erkrankungen ausgelöst werden. Durch den Vorgang des Filtrierens war es wahrscheinlich zu einem so starken Titerabfall gekommen, daß die vorhandene Virusmenge bei den Versuchstieren für eine manifeste Infektion nicht ausreichte.

Mit dem Filtrat der 203. Passage (das im Versuch an saugenden Mäusen als nicht-virushaltig erkannt war) wurde eine weitere Passage durchgeführt. Mit Embryomaterial der 204. Passage wurde ein Virusnachweis am 3-Tage-Ei angesetzt; der Versuch fiel erwartungsgemäß negativ aus. Daraufhin wurde der bis dahin gezüchtete HEP-Stamm abgesetzt, da diese geringe Virusmenge (wenn überhaupt vorhanden) nicht ausreichen würde, um damit Tiere zur Antiserum-Gewinnung infizieren zu können.

Als Ersatz dafür, und um nun, nachdem die Versuchstiere einen Schutz hatten, ein Virus mit größerer Aktivität zu applizieren, wurde der LEP-Stamm angezüchtet.

II. Nachweis

Im Pathogenitätstest an der saugenden Maus zeigten sich nach i. c. Inokulation des virushaltigen Materials am 3. Tage p. i. die ersten Krankheitserscheinungen wie Paresen besonders der Hinterhand, cerebrale Irritationerscheinungen (besonders Dreh- und Rollbewegungen) und Zitterkrämpfe. Spätestens am 6. Tage p. i. waren alle Tiere gestorben. Die bakteriologische Untersuchung der Mäusegehirne verlief jeweils negativ, so daß eine Meningo-Encephalitis bakterieller Art als Todesursache ausgeschlossen wer-

den konnte. Die Mutter der saugenden Mäuse zeigte nie irgendwelche Veränderungen, die auf eine Tollwutinfektion schließen ließen.

Die saugenden Mäuse, die mit Embryogehirnmaterial nicht-infizierter Hühnereier behandelt waren, wurden über 3 Wochen beobachtet; während dieser Zeit traten keinerlei Krankheitserscheinungen auf.

Der Beginn der klinischen Erscheinungen und der Zeitpunkt des Todes der Versuchstiere sind nach den einzelnen Versuchen in Tab. 4 zusammen- gestellt.

TABELLE 4
=====

Passagevirus	x Tage p. i.	lebend		Exitus
		gesund	krank	
Titrationseier der 194. Passage (HEP-Stamm)	3	1	1	3
	4		2	
	5			2
195. Passage (HEP-Stamm)	3	1	1	3
	4			2
Filtrat der 203. Passage	über 3 Wochen p. i. beobachtet	10	-	-
Embryogehirn- material (nicht infiziert)	über 3 Wochen p. i. beobachtet	10	-	-

Als weiteren Beweis für das Vorhandensein des Flury-Stammes starben nach Infektion von 3-Tage-Eiern diese Embryonen zwischen dem 5-10 Tage p. i. ab.

Noch in einer Verdünnung von 1 : 3 000 starben alle Embryonen ab. Da die Titrationsreihe aus äußeren Gründen nicht fortgeführt werden konnte, las- sen sich keine Aussagen über die genaue Höhe des Virustiters machen. Nach diesen Untersuchungsbefunden war die LD_{100} größer als $0,2 \times 10^{-3,47}$. Damit dürfte zum Nachweis, besonders aber zur Titration des Flury-Stam- mes das 3-Tage vorbebrütete Hühnerei mit Vorteil geeignet sein. Der Vor- teil besteht insofern, als zu diesem Zeitpunkt bereits die Entwicklung des Embryo zu erkennen ist und damit Fehlerquellen, die bei Verwendung

1-Tage vorbebrüteter Hühnereier entstehen könnten, ausgeschaltet werden. Zur endgültigen Klärung dieser Frage wären Vergleichsuntersuchungen angezeigt.

B Komplementbindungsreaktion (KBR)

I. Einfluß der Dichte der Antigensuspension

Um den Einfluß einer 20 %igen und einer 40 %igen Gehirnsuspension in der KBR zu prüfen, wurden diese Antigenkonzentrationen mit den positiven Vergleichsseren eines Meerschweinchens und eines Kaninchens getestet. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Reaktion. Jedoch war das Ergebnis der KBR bei Verwendung einer 20 %igen Suspension leichter ablesbar. Weshalb bei Prüfung der eigenen Seren grundsätzlich eine 20 %ige Gehirnsuspension verwendet wurde (mit Ausnahme von T 582).

TABELLE 5

Zusammenstellung der Reaktionen der Flury-Antiseren und der Anti-Embryogehirn-Seren

A. Virushaltige Antigene		Meerschweinchen			Anti-Embryogehirn-Seren der Tiere Nr.
Kaninchen	Antigen x Tage nach der xten Infektion	Flury-Antiseren der Tiere Nr.	Anti-Embryogehirn-Seren der Tiere Nr.	Flury-Antiseren der Tiere Nr.	
Bulle	6/2	1) EH		2) -8) ø	1) ø
		5) 1:5 +++		3) EH	
	7/4	1) 1:10 +++	1) 1:10 +++	2) 4) EH	3) EH
		2) 3) ø	2) 1:10 +++	5) -8) ø	
		4) 5) 1:10 ++			
	7/8	1) 1:10 ++	1) 1:10 +++		
		2) -5) ø	2) 1:10 +++		
	7/4	1) 1:10 +++			
		2) 1:10 ++			
		4) 1:5 +++			
T 582 (Kuh)		5) 1:10 +++			
	7/8	1) 1:5 +++			
		2) 3) ø			
		4) 1:10 +++			
		5) 1:10 +++			
T 593 (Reh)	6/2	1) 2) EH		3) EH	1) ø
	5/3	1) 1:10 +++		2) -8) ø	3) EH
		2) 1:40 +++			

7/8

2) 1:40 ++++ 2) -8) $\emptyset$ 3) EH
 3) 1:10 ++++ 7) 1:5 ++++ 4) EH
 4) 1:40 ++++
 5) 1:20 ++++

1) 1:20 ++++ 5) EH 3) EH
 2) 1:20 ++ 3) -8) $\emptyset$ 1) -2) $\emptyset$
 3) $\emptyset$

T 595 5 Monate/8 3) -5) $\emptyset$ 3) $\emptyset$
 (Fuchs)
 4) 1:20 ++++
 5) 1:10 ++++ 1) 1:20 ++++
 1) 1:5 ++ 2) 1:20 ++++
 2) 1:5 +++
 3) 1:5 +++
 4) 1:20 ++++
 5) 1:10 ++++

T 630+636 5 Monate/8 1) 1:10 ++++ 3) EH
 (Füchse)
 T 638 5 Monate/8 2) 1:10 ++++ 5) 1:10 ++
 (Schwein)
 1) $\emptyset$ 1) 1:10 ++++ 3) 1:5 +++
 2) 1:5 +++ 2) 1:10 ++++ 5) 1:5 +++
 3) 1:10 ++++
 4) 1:10 ++++
 5) 1:10 ++++

K +) 1) EH
 2) 1:40 ++++
 2) 1:10 ++++
 3) 1:40 ++
 4) 5) 1:20 ++++

T 657 5 Monate/8 1) 1:20 ++++ 3) $\emptyset$
 (Schaf)
 2) 1:10 ++++ 2) 1:20 ++++
 3) 1:5 +++
 5) 1:10 ++++

Booster- Injektion	1) 1:10 +++	1) 1:20 ++++	5) $\emptyset$	3) $\emptyset$
	2) 1:10 ++	2) 1:20 ++++		
	3) 1:10 ++++			
	4) 1:10 ++++			
	5) $\emptyset$			
K ⁺ Booster- Injektion	1) 1:40 ++	1) 1:40 ++++	5) $\emptyset$	3) $\emptyset$
	2) 1:10 ++++	2) 1:40 ++++		
	3) 1:40 ++			
	4) 1:20 ++++			
	5) 1:20 +++			
T 660 (Reh) K ⁺ Booster- Injektion	1) -5) $\emptyset$	1) $\emptyset$		
	1) 1:5 ++++	2) 1:10 +++		
	2) 1:10 +++	1) 1:10 ++++	5) $\emptyset$	
	3) EH			
	4) 1:20 +++			
T 661 (Fuchs) T 667 (Fuchs) K ⁺ Booster- Injektion	5) 1:5 ++++			
	1) -5)	1) $\emptyset$		
	1) 1:20 +++	2) 1:20 ++		
	2) 1:40 ++++	1) 1:40 ++++		
	3) EH			
	4) 1:20 ++++			
	5) 1:40 +++			

B Nicht-virushaltige Antigene

T 615 5/3 +1) 1:10 +++
(Reh) 7/8 +5) 1:10 +++
+1) 1:10 +++
+5) 1:10 +++

2) $\emptyset$
7) 1:5 ++

7/4
7/8 +5) $\emptyset$
+1) $\emptyset$
++2) $\emptyset$

7) $\emptyset$

T 588 6/2
(Reh) 7/4 1) 1:10 +++
3) $\emptyset$

1) 1:10 +++

2) $\emptyset$
5) EH
4) EH
5) $\emptyset$

T 315 7/8
(Fuchs) 5 Monate/8

2) $\emptyset$
1) -3) $\emptyset$
4) 1:5 ++
5) $\emptyset$

1) 1:10 +++
2) 1:10 +++

3) $\emptyset$

$\emptyset$ Schwein 5 Monate/8
T 652 5 Monate/8
(Fuchs)

3) 1:5 ++
5) 1:5 +++
1) $\emptyset$
2) $\emptyset$
3) 1:5 ++
5) 1:20 +++
1) 1:20 +++
2) 1:20 +++
3) 1:5 ++

K⁺)

Booster-
Injektion

1) 1:10 +++
2) 1:10 +++
3) 1:20 +++
4) 1:10 +++
5) 1:10 +++

5) $\emptyset$

3) 1:5 ++

T 643	Booster-	1) -4) ∅	1) 1:20 ++++	5) ∅	3) 1:5 ++
(Reh)	Injektion	5) 1:20 ++++	2) 1:40 ++		
K+)	Booster-	1) 1:5 - ++++	1) 1:20 ++++	5) ∅	
	Injektion	2) 1:10 ++			
		3) 1:5 +++			
		4) 1:10 ++++			

K⁺)

Ausführung der KBR in der Kältbindung

+ Antigen wurde in frisch aufgearbeitetem Zustand in der KBR verwendet

++ Antigen lagerte, bevor es in der KBR untersucht wurde, 10 Tage in der Tiefkühltruhe bei -20 Grad C und wurde in dieser Zeit 3mal eingefroren und aufgetaut.

TABELLE 6

Zusammenstellung der Reaktionen der S-Seren und der vor Immunisierungsbeginn gewonnenen Seren

A Virushaltige Antigene

S-Seren		Vor Immunisierungsbeginn ge- wonnene Seren		
Antigen	Kaninchen	Meerschwein- chen	Kaninchen	Meerschweinchen
Bulle	1) 1:10 ++ 2) ∅ 3) ∅			1) ∅ 2) ∅
T 594 (Fuchs)	1) 1:10 +++ 2) 1:5 +++ 3) 1:10 +++	1) ∅ 2) ∅	2) ∅ 3) 1:10 ++++ 4) ∅	
T 595 (Fuchs)	1) 1:10 ++++ 2) 1:10 ++++ 3) 1:10 ++++			
T 630+636 (Füchse)		3) ∅ 4) ∅	2) 1:10 ++++ 3) 1:10 ++++ 4) 1:5 ++++	
T 638 (Schwein)	1) 1:10 ++++ 2) 1:10 ++++ 3) 1:10 ++++	1) 1:5 ++ 2) ∅ 3) ∅ 4) ∅	2) 1:10 ++++ 3) 1:10 ++++ 4) 1:10 ++++ 5) 1:5 ++++ 6) ∅ 7) 1:40 +++	
T 657 (Schaf)	1) 1:10 ++++ 2) 1:5 ++++ 3) 1:5 ++++		1) 1:5 ++++ 2) ∅ 3) 1:10 ++++ 4) 1:5 +++ 5) ∅ 6) ∅ 7) 1:10 ++++	
K ⁺)	4) 1:40 ++++ 5) 1:40 +++	1) ∅ 2) ∅	5) EH 6) EH 7) 1:40 ++++	1) - 12) ∅
T 660 (Reh) K ⁺)	4) ∅ 5) ∅	2) ∅ 3) EH	5) ∅ 6) 1:5 ++++ 7) ∅	1) - 12) ∅

B Nicht-virushaltige Antigene

Ø Schwein	1) Ø		2) Ø	
	2) 1:5 ++		4) Ø	
	3) Ø		5) 1:5 ++++	
			6) Ø	
			7) 1:10 ++++	
T 588	1) 1:10 ++++	2) Ø	2) 1:10 ++++	
(Reh)	1) 1:10 ++++	3) Ø	4) 1:10 ++++	
	3) EH	4) Ø		
T 615	1) 1:5 +++		4) 1:10 ++++	
(Reh)	2) 1:10 ++			
	3) EH			
T 643	4) Ø	3) Ø	5) EH	1) -12) Ø
(Reh)				
K ⁺)	5) Ø	4) EH	6) 1:5 ++++	
			7) 1:20 ++++	
T 652	1) Ø	1) Ø	2) 1:5 ++++	
(Fuchs)	2) Ø	2) Ø	3) 1:10 +++	
	3) Ø	3) Ø	4) 1:5 ++	
		4) Ø	5) 1:5 ++	
			6) Ø	
			7) 1:10 +++	
K ⁺)	4) 1:40 ++++	1) 1:5 ++	5) EH	1) - 12) Ø
	5) 1:40 ++++	2) Ø	6) EH	
			7) 1:40 ++	

K⁺)

Ausführung der KBR in der Kältebindung

II. Prüfung der virushaltigen und nicht-virushaltigen Antigene (vgl. Tab. 5 - 7)

a) Vergleichsseren

1) virushaltige Antigene :

Das positive Vergleichsserum vom Kaninchen zeigte in 33 Serumansätzen gegen 11 virushaltige Antigene nur 4mal (12, 1%) Hämolyse; sonst regelmäßig Hemmung der Hämolyse bei einer Serumverdünnung von 1:5 bis 1:20 (87, 9%).

Das positive Vergleichsserum vom Meerschweinchen zeigte mit 3 virushaltigen Antigenen weder bei einer Antigenkonzentration von 20 % noch bei einer solchen von 40 % an. Weshalb von einer weiteren Verwendung dieses Serums abgesehen wurde.

2) nicht-virushaltige Antigene :

Das positive Vergleichsserum vom Kaninchen wurde in 15 Serumansätzen gegen 6 nicht-virushaltige Antigenproben geprüft. Einmal trat Eigenhemmung auf; 6mal (40 %) negative Reaktion und 8mal (53, 3 %) positive Reaktion. Bei positivem Ergebnis lagen die Titer nie höher als 1:10.

Das Vergleichsserum vom Meerschweinchen wurde nur einmal geprüft, weshalb sich keine Aussagen machen lassen.

b) Vor Immunisierung gewonnene Seren

1) virushaltige Antigene :

Die Seren, die von den Kaninchen vor der ersten Injektion gewonnen waren wurden in 25 Ansätzen gegen 5 virushaltige Antigene getestet. Obwohl diese Seren also weder Antikörper gegen den Flury-Stamm noch gegen Hühneremryo-Gehirnmateriale enthalten konnten, fiel die KBR 15mal (60 %) positiv aus (mit Titern bis 1:40) gegenüber einer 8maligen (32 %) negativen Reaktion bei 2maliger (8 %) Eigenhemmung. Bei 60 % der Serumansätze trat also eine unspezifische Reaktion auf.

Dagegen zeigten die Meerschweinchenserum, die vor der ersten Injektion gewonnen waren in 26 Serumproben gegen 3 virushaltige Antigene keinerlei unspezifische Reaktionen.

TABELLE 7

Zusammenstellung der in der KBR geprüften Seren und der Antigene

Virushaltige Antigene		Nicht-virushaltige Antigene									
Kaninchenserum	Zahl der bindenden Antikörper	Ergebnis der KBR		Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Zahl der Serum-Anti-ansätze	Ergebnis der KBR
		Zahl	Ø								Ergebnis der KBR
Auf komplement-bindende Antikörper geprüfte Seren		1:5	1:10	1:20	1:40	EH					1:5 1:10 1:20 1:40 EH
Vergleichsseren	33	11	4	3	21	5	15	6	6	3	5
				12,1%	9,1%	63,6%	15,1%		40%	20%	33,3%
Vor Immunisierung gewonnene Seren	25	5	8	5	8	2	20	5	4	5	5
			32%	20%	32%	8%	8%		20%	25%	25%
Flury-Antiseren	4	2		1		3	1	1			1
post 2. Vacc.	5	1			2	1	2	1			2
post 3. Vacc.	9	2	2	1	6		2	2	2		
post 4. Vacc.	15	3	7	1	4	3	5	2	3		2
post 8. Vacc.	24	4	1	6	12	3	11	3	6	4	1
5 Mon.p.8.V.	33	4	11	2	6	8	17	2	7	2	6
Booster-Infektion	90	16	21	11	30	15	38	11	18	6	11
				23,3%	12,2%	33,3%	16,6%	8,8%	47,3%	15,7%	28,9%
											7,8%

Anti-Embryo- gehirn-Seren	25	8	2	11	7	4	1	12	5	3	6	3
			87%	44%	28%	16%	4%			25%	50%	25%
S-Seren	19	6	4	3	10	2		16	5	7	2	3
			21%	15,7%	52,6%	10,5%				43,7%	12,5%	12,5%

Meerschweinchen- seren	6	3	5					1	1	1	1	
Vergleichseren												
Vor Immunisie- rung gewonnene Seren	26	3	26					24	2	24		
Flury-Antiseren												
post 3. Vacc.	17	2	14	1				2	2	1	1	1
post 5. Vacc.	13	2	10					3	3	2	2	
5 Mon. p. 8. V.	8	4	4	2	1			1	5	3	3	2
Booster-Injektion	3	2	3									
	41	10	31	3	1			6	13	8	9	3
			75,6%	7,3%	2,4%			14,6%			69,2%	23%
Anti-Embryo- gehirn-Seren	12	5	8					4	5	4	2	2
			66,6%					33,4%			40%	40%
S-Seren	12	5	10	1				1	11	3	9	1
			83,3%	8,3%				8,3%			81,8%	9,9%
Rinder-Normal- seren	23	9	23					11	5	10		1
Pferde-Normal- seren	4	3	4					2	1	2		

2) nicht-virushaltige Antigene :

Von Kaninchenserum wurden 20 Ansätze gegenüber 5 nicht-virushaltigen Antigenproben geprüft. 3mal (15 %) wurde Eigenhemmung beobachtet; 4mal (20 %) Hämolyse; gegenüber 13 (65 %) positiven Reaktionen, wovon 3 (15 %) höher als 1:10 lagen.

Hingegen trat bei 24 Meerschweinchenansätzen nie eine positive Reaktion auf.

c) Flury-Antiseren

1) virushaltige Antigene :

Die Flury-Antiseren der Kaninchen wurden in insgesamt 90 Serumansätzen gegen 16 Antigenproben getestet. Dabei fiel bei 23,3 % die KBR negativ aus; bei 5,5 % trat Eigenhemmung auf; also 71,2 % positive Reaktionen, wobei Titer bis 1 : 40 erreicht wurden (bei 8,8%). Jedoch lagen die meisten der positiven Reaktionen (33,3 %) bei einer Serumverdünnung von 1:10; 25,4 % der positiven Reaktionen zeigten höhere Titer als 1:10.

Bewertet man den Zeitpunkt der Serumgewinnung, so ist zu erkennen, daß nach der 4. Vaccination die Titer nicht höher als 1:10 lagen, nach der 8. nicht höher als 1:20, während 5 Mon. nach der 8. (8,3 %) und nach der Boosterinjektion (12,1 %) Titer bis 1:40 erreicht wurden. Auch nach der 3. Vaccination konnten in 2 Serumansätzen bereits Titer bis 1:40 nachgewiesen werden.

Die Flury-Antiseren der Meerschweinchen wurden in insgesamt 41 Ansätzen gegen 10 virushaltige Antigenproben getestet. In 75,6 % war das Ergebnis der KBR negativ; in 14,6 % trat Eigenhemmung auf. Es fand sich also nur bei 9,8 % ein positives Ergebnis, wobei die Titer höchstens 1:10 erreichten.

2) nicht-virushaltige Antigene :

Um unspezifische Reaktionen zu erkennen, wurden 38 Serumansätze, die von den immunisierten Kaninchen stammten gegen 11 nicht-virushaltige Antigenproben getestet. Dabei zeigte sich bei 18 (47,3 %) Ansätzen ein negativer Ausfall der KBR. Der Rest (52,7 %) reagierte positiv; wovon allerdings nur 3 Ansätze (7,8 %) einen höheren Titer als 1:10 erreichten.

Die günstigsten Ergebnisse, d. h. am häufigsten negativer Ausfall der KBR wurden mit Seren, die nach der 4. (100 %), 8. (60 %), 5 Monate nach der 8. Vaccination (54,5%) und nach der Booster-Injektion (41,1 %) gewonnen waren, erreicht.

13 Meerschweinchen-Anti-Fluryseren wurden gegen 8 nicht-virushaltige Antigenproben geprüft : einmal Eigenhemmung (7,6 %) 3 mal (23 %) Hemmung der Hämolyse und 9mal (69,2 %) negativer Ausfall der KBR zeigen ein günstigeres Ergebnis als die Flury-Antiseren der Kaninchen.

d) Anti-Embryogehirn-Seren

1) virushaltige Antigene :

25 Ansätze von Kaninchen-Anti-Embryogehirn-Seren wurden gegen 8 virushaltige Antigenproben getestet. Dabei fiel die KBR nur 2mal (8 %) negativ aus; 1 mal (4 %) trat Eigenhemmung auf; und somit 88 % positiver Ausfall der KBR. Auch hier wieder wurden Titer von 1:40 erreicht. Fiel die KBR positiv aus, so lagen 50 % der Titer bis 1:10, die anderen 50 % höher als 1:10.

12 Ansätze von Meerschweinchen-Anti-Embryogehirn-Seren wurden gegen 5 virushaltige Antigenproben getestet. Entweder zeigte sich ein negatives Ergebnis (66,6 %) oder Eigenhemmung (33,4 %).

2) nicht-virushaltige Antigene :

Es wurden 12 Ansätze von Kaninchen-Anti-Embryogehirn-Seren gegenüber 5 nicht-virushaltige Antigenproben geprüft. Dabei traten nur positive Reaktionen in der KBR auf; wobei Titer bis 1:40 erreicht wurden. D.h. also, daß bei der Reaktion zwischen Seren, die keine Antikörper gegen den Flury-Stamm enthielten und Gehirnmaterial, das kein Flury-Antigen enthielt trotzdem die KBR in jedem Fall der einzelnen Proben positiv ausfiel.

Von den 5 Meerschweinchen-Anti-Embryogehirn-Seren, die gegen 4 nicht-virushaltige Antigenproben geprüft wurden, reagierten 2 (40 %) negativ, 2 (40 %) positiv (1 : 5) und bei einem Serum (20 %) trat Eigenhemmung auf.

e) S-Seren

1) virushaltige Antigene :

19 Ansätze wurden mit Seren, die von mit Viren der Psittakose-Lymphogranuloma-Gruppe infiziertem 15 Tage altem Hühnerembryomaterial sensibilisierten Kaninchen gewonnen waren gegen 6 virushaltige Antigenproben durchgeführt. Nur 4 Ansätze (21 %) reagierten negativ; während der Rest (79 %) Hemmung der Hämolyse zeigte. Davon erreichten jedoch nur 2 Serumproben (10,5 %) Titer, die höher als 1:10 lagen.

12 S-Seren, die von Meerschweinchen stammten und gegen 5 virushaltige Antigene getestet wurden, ergaben einmal (8,3 %) Eigenhemmung und 10mal (83,3 %) Hämolyse; gegenüber einem einzigen (8,3 %) positiven Ausfall der KBR, wobei nur ein Titer von 1:5 erreicht wurde.

2) nicht-virushaltige Antigene :

Von Kaninchen wurden 16 S-Seren gegen 5 nicht-virushaltige Antigene untersucht. 2mal (12,5 %) zeigte sich Eigenhemmung; 7mal (43,7 %) negative Reaktion. Die restlichen 7 Ansätze (43,7 %) reagierten positiv bis zu einer Verdünnung von 1:40.

Bei den 11 Meerschweinchenseren, die gegen 3 nicht-virushaltige Antigene untersucht wurden, trat einmal (9,9 %) Eigenhemmung auf; einmal (9,9 %) positive Reaktion mit einem Titer von 1:5; der Rest der Ansätze reagierte negativ (81,8 %).

f) Rindernormal- und Pferdenormal-Seren

1) virushaltige Antigene :

Gegen 9 virushaltige Antigenproben wurden 23 Rindernormal-Serumansätze getestet. Dabei zeigte sich regelmäßig ein negativer Ausfall der KBR. Das gleiche gilt für 4 Pferdenormalseren, die gegen 3 virushaltige Antigenproben getestet wurden.

2) nicht-virushaltige Antigene :

Gegenüber insgesamt 6 nicht-virushaltigen Antigenen wurden 11 Rindernormal- und 2 Pferdenormalseren getestet. Bei beiden Serumarten trat nie eine positive Reaktion auf. Ein Rindernormalserum (9,1 %) zeigte Eigenhemmung.

III. Reaktion der einzelnen Kaninchenseren

Gegen virushaltige Antigene wurden insgesamt 90 Flury-Antiserum-Ansätze, die von 5 immunisierten Kaninchen stammten in der KBR untersucht (vgl. Tab. 8). In 71,2% der Untersuchungen fiel die KBR positiv aus, in 23,3 % der Untersuchungen fiel die KBR negativ aus, während bei 5,5 % Eigenhemmung auftrat. Kaninchen Nr. 1, 4, 5 lagen in der Häufigkeit der positiven

TABELLE 8

Reaktion der einzelnen Kaninchenseren (untersuchte Seren : Flury-Antiseren)

Kaninehen Nr.	Virushaltige Antigene			Nicht-virushaltige Antigene		
	reagierte x-mal positiv	reagierte x-mal negativ	x-mal Eigen- hemmung	reagierte x-mal positiv	reagierte x-mal negativ	x-mal Eigen- hemmung
1	14 (73, 6%)	3 (15, 8%)	2 (10, 6%)	5 (41, 6%)	7 (58, 4%)	-
2	13 (68, 5%)	5 (26, 3%)	1 (5, 2%)	2 (28, 5%)	5 (71, 5%)	-
3	10 (55, 5%)	6 (33, 3%)	2 (11, 2)	4 (57, 1%)	3 (42, 9%)	-
4	13 (81, 2%)	3 (18, 8%)	-	3 (75%)	1 (25%)	-
5	14 (77, 7%)	4 (22, 3%)	-	6 (75%)	2 (25%)	-
64	71 (71, 2%)	21 (23, 3%)	5 (5, 5%)	20 (52, 6%)	18 (47, 4%)	-

Reaktionen über dem Durchschnitt von 71,2 %. Kaninchen Nr. 3 zeigte mit nur 55,5 % positiven Reaktionen die meisten unspezifischen Reaktionen; auch zeigte dieses Serum am häufigsten Eigenhemmung.

Gegen nicht-virushaltige Antigene wurden insgesamt 38 Serumansätze, die von den mit Flury-Material immunisierten Kaninchen gewonnen waren, getestet. Im Vergleich zu der Prüfung mit virushaltigen Antigenen zeigten diese Seren bei Verwendung von A-antigenen nicht infizierter Tiere nie Eigenhemmung. 52,6 % der Untersuchungen fielen positiv aus und 47,4 % negativ. Davon reagierten die Seren von Kaninchen Nr. 1 und 2 prozentual häufiger negativ als der Durchschnitt von 47,4 %.

IV. Einfluß der Tierart auf die komplementbindende Aktivität des Antigens

Der Einfluß der Tierart, von der das in der KBR verwendete Antigenmaterial gewonnen wurde, auf das Ergebnis der KBR ist in Tabelle 9 zusammengestellt. 6 virushaltige von Herbivoren stammende Antigene wurden gegen 64 Flury-Antiseren getestet. 16 Proben (25 %) reagierten negativ; 4 (6,2 %) zeigten Eigenhemmung. Der Rest (68,8 %) reagierte positiv; wobei 20,3 % der Serumproben einen höheren Titer als 1:10 erreichten.

1 virushaltiges von einem Omnivor gewonnenes Antigen, das gegen 11 Serumansätze getestet wurde, zeigte nie Eigenhemmung; 1mal (9,9 %) negatives Ergebnis. Der Rest (91,1 %) reagierte positiv, wovon 36,3 % der Serumproben einen höheren Titer als 1:10 erreichten.

An nicht-virushaltigen Antigenen wurden die Gehirne folgender Tierarten geprüft :

3 Herbivoren gegen 22 Serumansätze. Dabei reagierten 8 Ansätze (36,3 %) negativ und 63,7 % positiv, wobei nur 1 Serum (4,5 %) einen höheren Titer als 1:10 erreichte.

Bei 2 nicht-virushaltigen Karnivorengehirnen trat gegenüber 17 Serumansätzen 8mal Hämolyse und 9mal Hemmung der Hämolyse auf. In 2 Fällen wurde ein höherer Titer als 1:10 erreicht.

Ein von einem Omnivor gewonnenes nicht-virushaltiges Antigen ergab gegenüber 3 Serumproben 1mal negatives und 2mal positives Ergebnis, wobei der Titer nie höher als 1:5 lag.

TABELLE 9

Nach Tierarten zusammengestellte in der KBR geprüfte Antigene

Virushaltige Antigene						Nicht-virushaltige Antigene								
Tierart	Zahl d. Ø	Ergebnis der KBR				EH	Zahl d. Ø	Ergebnis der KBR				EH	Tierart	
		1:5	1:10	1:20	1:40			1:5	1:10	1:20	1:40			
Serum-ansätze						Serum-ansätze								
Rehe 3	25	6	3	5	6	2	3	22	8	4	9	1	3	Rehe
Rinder 2	23	8	3	11			1							
Schaf 1	16	2	2	7	3	2								
Herbivo- ren 6	64	16	8	23	9	4	4	22	8	4	9	1		
		25%	12, 5%	35, 9%	14, 1%	6, 2%	6, 2%		36, 3%	18, 2%	40, 9%	4, 5%	3	Herbivoren
Karnivo- ren 5	25	7	4	8	3	2	1	17	8	2	5	2		
(Füchse 5)		28%	16%	32%	12%	8%	1%		47, 1%	11, 7%	29, 4%	11, 7%	2	Karnivoren
Omnivor 1	11	1	1	5	2	2		3	1	2			1	Omnivor
(Schwein 1)		9, 2%	9, 2%	45, 4%	18, 1%	18, 1%			33, 3%	66, 6%				

geprüfte Seren : Flury-Antiseren der 5 Kaninchen und ein positives Vergleichsserum vom Kaninchen

Bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene in der KBR trat gegenüber virushaltigen Antigenen nie Eigenhemmung auf. Außerdem wurde nie ein Titer von 1:40 erreicht, ein Titer von 1:20 nur bei 3 Serumproben (7, 8%). Wohingegen bei Verwendung virushaltigen Antigenmaterials 8mal (8, 8%) ein Titer von 1:40 und 15mal (16, 6%) ein solcher von 1:20 erreicht wurde.

Während also bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene nur 7, 8% der positiven Reaktionen einen höheren Titer als 1:10 zeigten, waren dies bei Verwendung virushaltigen Antigenmaterials 25, 4 %.

V Vergleich zwischen Wärmebindung und Kältebindung (vgl. Tab.10)

Hierzu wurden nur Kaninchenserum verwendet

a) Vergleichsserum

Das positive Vergleichsserum wurde gegen ein virushaltiges und ein nicht-virushaltiges Antigen geprüft. Bei Verwendung des virushaltigen Antigens trat in der Wärmebindung Hämolyse auf; während in der Kältebindung ein positives Ergebnis mit einem Titer von 1:10 beobachtet wurde. Bei Verwendung des negativen Antigens wurde in der Wärmebindung ein Titer von 1:5 ermittelt; während in der Kältebindung ein solcher von 1:10 erreicht wurde.

b) Vor Immunisierung gewonnene Seren

Bei den Kaninchenserum, die vor Immunisierungsbeginn gewonnen waren, zeigte sich gegenüber einem virushaltigen Antigen bei 2 Tieren, die in der Wärmebindung negativ reagierten in der Kältebindung Eigenhemmung. Bei einem Tier, das in der Wärmebindung bis zu einer Serumverdünnung von 1:10 anzeigte, wurde in der Kältebindung ein Titer von 1:40 erreicht.

Bei Prüfung der Seren mit nicht-virushaltigem Antigenmaterial trat in der Wärmebindung bei einem Kaninchenserum Hämolyse, bei einem anderen ein Titer von 1:5 auf; beide Seren zeigten in der Kältebindung Eigenhemmung. Ein Serum, das in der Wärmebindung bis 1:20 anzeigte, erreichte in der Kältebindung einen Titer von 1:40.

c) Flury-Antiseren

Der Einfluß der Kältebindung wurde für die Flury-Antiseren der Versuchskaninchen bei 3 virushaltigen und 2 nicht-virushaltigen Antigenen geprüft.

Bei den virushaltigen Antigenen zeigte sich bei 6 Seren, die in der Wärmebindung negativ reagierten in der Kältebindung 1mal Eigenhemmung und 5mal (83,3%) ein positives Ergebnis; eines dieser Seren zeigte in der Kältebindung sogar einen Titer bis 1:40. Von 8 Serumproben, die bereits in der Wärmebindung positiv reagierten, ließen 62,5 % einen Titeranstieg um eine Verdünnungsstufe erkennen, 12,5% erreichten einen Titeranstieg um zwei Verdünnungsstufen, weitere 12,5% der Seren ließen keinen Titeranstieg erkennen, während die restlichen 12,5%, die in der Wärmebindung positiv reagierten, in der Kältebindung Hämolyse zeigten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß von insgesamt 14 untersuchten Flury-Antiseren gegenüber 3 virushaltigen Antigenen 50 % in der Kältebindung einen Titeranstieg von einer Stufe zeigten. Bei 14,3% wurde ein Anstieg um 2 Verdünnungsstufen ermittelt, bei 7,1% ein solcher um 3 und ebenfalls bei 7,1 % ein solcher um 4 Verdünnungsstufen. Dies bedeutet, daß bei 78,5% der untersuchten Seren in der Kältebindung ein Titeranstieg gegenüber der Wärmebindung auftrat. Die restlichen 21,5 % der Seren zeigten entweder gleichbleibende (7,1%) oder abfallende (7,1%) Titerwerte; oder es trat Eigenhemmung (7,1%) auf.

Bei Prüfung der nicht-virushaltigen Antigene zeigte sich ein ähnliches Bild : 6 in der Wärmebindung negativ reagierende Serumproben zeigten in der Kältebindung ein positives Ergebnis mit Titern bis 1:10. Eine Serumprobe, die in der Wärmebindung 1:5 anzeigte, erreichte in der Kältebindung eine Serumverdünnung von 1:20. Auch hier ließ wiederum eine Serumprobe einen Titerabfall in der Kältebindung gegenüber der Wärmebindung erkennen.

Bei also insgesamt 8 geprüften Flury-Antiserum-Proben gegen 2 nicht-virushaltige Antigene wurde bei 25% ein Titeranstieg um eine Stufe und bei 62,5% ein solcher um 2 Verdünnungsstufen ermittelt, d.h. bei 87,5% der Serumproben wurde in der Kältebindung ein Titeranstieg beobachtet. Die restlichen 12,5% zeigten einen Titerabfall.

Somit lag bei Verwendung von nicht-virushaltigem Antigenmaterial gegenüber Flury-Antiseren der Prozentsatz der Serumproben, die in der Kältebindung einen Titeranstieg erkennen ließen um 9% höher als bei Verwendung von virushaltigem Antigenmaterial.

TABELLE 10

Vergleich zwischen Wärme- und Kältebindung

<u>Wärmebindung</u>							<u>Kältebindung</u>						
Antigen	Kanin-	Ø	1:5	1:10	1:20	1:40	EH	Ø	1:5	1:10	1:20	1:40	EH
chen													
Nr.													

a) Vergleichsserum

<u>virushaltige Antigene</u>													
T 657	Ø								++++	++++			
<u>nicht-virushaltige Antigene</u>													
T 652	++								++++	++++			

b) Vor Immunisierung gewonnene Seren

<u>virushaltige Antigene</u>													
T 657	5	Ø											EH
	6	Ø											EH
	7	++++	++++						++++	++++	++++	++++	
<u>nicht-virushaltige Antigene</u>													
T 652	5	++											EH
	6	Ø											EH
	7	++++	++++	+++					++++	++++	++++	++	

c) Flury-Antiseren

<u>virushaltige Antigene</u>													
T 660	1	Ø							++++				
	2	Ø							++++	+++			
	3	Ø											EH
	4	Ø							++++	++++	+++		
	5	Ø							++++				
T 657	1	+++							++++	+++			
	2	++++	++++						++++	++			
	3	+++							++++	++++			
	5	++++	++++					Ø					
T 638	1	Ø							++++	++++	+++	++	
	2	+++							++++	++++			
	3	++++	++++						++++	++++	++++		
	4	++++	++++						++++	++++	++++		
	5	++++	++++										

	nicht-virushaltige Antigene		
T 643	1	Ø	++++
	2	Ø	++++ ++
	3	Ø	+++
	4	Ø	++++ ++++
T 652	1	Ø	++++ ++++
	2	Ø	++++ ++++
	3	++	++++ ++++ ++++
	5	++++ ++++ +++	++++ ++++

d) Anti-Embryogehirn-Seren

	virushaltige Antigene		
T 660	1	Ø	++++ ++++
	2	++++ +++	++++ ++++
T 657	1	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++ ++++
	2	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++ ++++
T 638	1	++++ ++++	++++ ++++ ++++ ++++
	2	++++ ++++	++++ ++++ ++++ ++++
	nicht-virushaltige Antigene		
T 643	2	++++ ++++ ++++ ++	++++ ++++ ++++
T 652	1	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++ +++
	2	++++ ++++ ++++	++++ ++++ ++++ +++

EH

d) Anti-Embryogehirn-Seren

Die beiden Anti-Embryogehirn-Seren wurden in 6 Ansätzen gegen 3 virus-haltige Antigene geprüft. Bei 66,6 % war in der Kältebindung ein Titeran-stieg gegenüber der Wärmebindung erkennbar (33,3% um eine und eben-falls 33,3% um 2 Verdünnungsstufen). Die restlichen Proben zeigten entwe-der gleichbleibende Titer (16,6%) oder Eigenhemmung (16,6%).

Bei 3 Serumproben gegen 2 nicht-virushaltige Antigene wurde 2mal ein Ti-teranstieg um eine Verdünnungsstufe und einmal ein gleichbleibender Titer ermittelt.

e) S-Seren

Über den Einfluß der Kältebindung auf die Reaktion der S-Seren läßt sich keine Aussage machen, da vergleichsweise nicht die gleichen Kaninchen-seren untersucht wurden.

C Präzipitationsreaktion

Mit Hilfe der Präzipitationsreaktion wurden die aus Tabelle 11 ersichtlichen virushaltigen Antigene auf spezifische Reaktionen geprüft. Die Antigene wurden einerseits gegen das bereits in der KBR als positiv erkannte Vergleichsserum vom Kaninchen und gegen Flury-Antiseren, die zu den verschiedensten Zeitpunkten gewonnen waren, getestet; und andererseits zum Ausschluß evtl. auftretender unspezifischer Reaktionen gegen Seren von jeweils einem Meerschweinchen und einem Kaninchen, die vor Immunisierungsbeginn gewonnen waren (also keine Antikörper gegen den Flury-Stamm bzw. embryonales Hühnereiweiß enthalten konnten) und Meerschweinchen-Anti-Embryogehirn-Seren (also nur Antikörper gegen embryonales Hühnereiweiß enthielten) geprüft.

Obwohl von einigen Autoren (besonders VILLEMONT und PROVOST (150) und FRAS und GRMOVSEK (46) auf die Treffsicherheit und Spezifität der Präzipitationsreaktion auf Tollwut hingewiesen wird, konnte in keinem Fall der geprüften virushaltigen Antigene eine Präzipitationsbande nachgewiesen werden.

TABELLE 1
=====

Zusammenstellung der in der Agar-Präzipitationsreaktion geprüften virushaltigen Antigene gegen die verschiedenen Seren

Geprüfte Seren	Geprüfte Antigene der Tierarten			
	Reh	Rind	Fuchs	Schwein
Vergleichsserum (Kaninchen)	3	2	2	1
Vor Immunisierung gewonnene Seren				
Kaninchen Nr. 2	2	1	1	
Meerschweinchen Nr. 10	1	2	2	1
Flury-Antiseren				
Kaninchen Nr. 2 +	1	1	1	1
Kaninchen Nr. 4 +	2			2
Kaninchen Nr. 5 ++		2	2	
Huhn Nr. 4 +++	1		1	
Huhn Nr. 5 ++			2	
Huhn Nr. 5 +++	1			1
Anti-Embryogehirn-Seren				
Meerschweinchen Nr. 1 +++		2		
Meerschweinchen Nr. 2 +++	1			1
Meerschweinchen Nr. 3 ++		1		1

+ = Seren, die jeweils 7 Tage nach der 4. Injektion gewonnen waren
 ++ = Seren, die jeweils 6 Tage nach der 2. Injektion gewonnen waren
 +++ = Seren, die jeweils 7 Tage nach der 5. Injektion gewonnen waren

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die serologische Diagnose der Tollwut erfolgt neben dem Nachweis mit Hilfe fluoreszierender Antikörper besonders mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR) und der Präzipitationsreaktion im Agargel. Die Serumneutrisationsreaktion spielt als Verfahren für die Routineuntersuchung keine Rolle. In der vorliegenden Arbeit sollte der Gehalt an komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern in Flury-Antiseren geprüft werden.

Für die genannten serologischen Reaktionen müssen neben der sorgfältigen Aufarbeitung der zu prüfenden Antigene vor allem hochwertige Hyperimmunsereen zur Verfügung stehen. Die Herstellung rabizider Seren mit hohem Antikörpergehalt ist zum einen mit Schwierigkeiten verbunden, und zum anderen für das Laboratoriumspersonal nicht ungefährlich, da die Tiere, die als Serumspender dienen im allgemeinen mit hochinfektiösem Tollwutvirus (meist Straßenvirus oder Virus-fixe) infiziert werden. Schließlich sind wirtschaftliche Momente zu berücksichtigen, da der routinemäßigen Anwendung die hohen Herstellungskosten der Testseren entgegenstehen.

Um das Arbeiten mit hochinfektiösem Tollwutvirus zu umgehen, wurde bei vorliegenden Versuchen der Flury-Stamm als hyperimmunisierendes Antigen verwendet; für welchen KOPROWSKI und COX (72) von der 180. Passage an einen vollkommenen Pathogenitätsverlust (die saugende Maus bei i. c. Inokulation ausgenommen) nachweisen konnten. Dabei wurde bei Applikation des Flury-Stammes bewußt darauf verzichtet, den Viruseffekt stimulierende Adjuvantien hinzuzugeben. Es sollte geprüft werden, inwieweit der Flury-Stamm in der Lage ist, bei den verwendeten Versuchstieren (8 Meer-schweinchen, 5 Kaninchen, 5 Hühner) einen genügend hohen Antikörperspiegel zu erzeugen.

Das zu verimpfende Antigenmaterial wurde durch Züchtung des Flury-Stammes in der Hühnereikultur (dabei wurde nach Angaben von KOPROWSKI und COX (72) u. a. verfahren) gewonnen. Dazu wurden 2 Flury-Virus-Stämme über insgesamt 15 bzw. 3 Hühnereipassagen geführt. Um die Gewißheit zu haben, den Tieren mit Sicherheit virushaltiges Material zu applizieren, wurde Material verschiedener Eipassagen auf seinen Virusgehalt geprüft.

Der Nachweis des Flury-Stammes erfolgte zum einen durch i. c. Inokulation des zu prüfenden Materials an saugende Mäuse (KOPROWSKI und COX, 72).

Nach Applikation von virushaltigem Material aus 2 verschiedenen Hühnereipassagen an je 5 saugende Mäuse kamen alle Tiere nach spätestens 5 Tagen p.i. unter dem klinischen Bild einer Tollwutinfektion ad exitum. Mit nicht-infektiösem Embryogehirnmaterial angesetzte Kontrollversuche verliefen über einen entsprechend langen Beobachtungszeitraum negativ.

Das Vorhandensein des Flury-Stammes in der Eikultur wurde zum anderen mit Hilfe der Infektion von 3 Tage vorbebrüteten Hühnereiern geprüft; im Gegensatz zu KUMA (80) und YOSHINO (156) die die Verwendung von 1 Tage-Eiern empfehlen. Es zeigte sich das 3 Tage-Ei für den Flury-Stamm als genügend empfindlich. Dazu bietet es den Vorteil, daß im Gegensatz zum 1 Tage-Ei eine Nicht-Befruchtung mit Sicherheit zu erkennen ist; wodurch eine Infektion unbefruchteter Eier verhindert werden konnte.

Somit war sowohl mit Hilfe von saugenden Mäusen als auch 3 Tage vorbebrüteten Hühnereiern der Nachweis für das Vorhandensein des Flury-Stammes in der Eikultur erbracht. Daneben mußte die Höhe des Virustiters der Eikultur ermittelt werden, um die Gewißheit zu haben, die Versuchstiere mit einer ausreichenden Virusmenge zu infizieren. Es wurden dazu ebenfalls mit Erfolg 3 Tage vorbebrütete Hühnereier herangezogen; im Gegensatz zu KUMA (80) und YOSHINO (156), die auch hier wieder das 1 Tage-Ei empfehlen. Denn gerade bei der Titration erscheint es wichtig, mit Sicherheit ausschließlich befruchtete Hühnereier mit dem zu prüfenden Material zu infizieren, um die Anzahl der pro Verdünnungsstufe zu infizierenden Eier bei der Titration festlegen zu können. Die Titration erfolgte bis zu einer Verdünnungsstufe von $1 : 3\,000$. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden dabei ein Embryonengehirn geerntet und in der üblichen Weise saugenden Mäusen appliziert. Da alle Tiere ad Exitum kamen, war der Nachweis für ein spezifisches Absterben der in steigenden Verdünnungsstufen infizierten 3 Tage-Eier erbracht. Zur Klärung der Frage, ob 3 Tage-Eier ebenso günstig wie 1 Tage-Eier zur Titration herangezogen werden können, wären jedoch weitere Versuche notwendig, da diese aus äußeren Gründen nicht fortgeführt werden konnten.

Die LD 100 der Flury-Eikultur lag höher als $0,2 \times 10^{-3}$,⁴⁷. Somit wurden bei jeder Injektion bei einer Inokulationsmenge von 1,0 ml für Kaninchen und Hühner und 0,7 ml für Meerschweinchen jedem Versuchstier jeweils mindestens 1 500 bzw. 1 050 tödliche Dosen injiziert; wobei der Grenztiter nicht bestimmt war. Die Immunisierungsversuche liefen über 7 1/2 Monate; während welcher Zeit 8 Injektionen und eine Booster-Injektion durchgeführt wurden, so daß genügend Zeit zur Ausbildung von Antikörpern gegen den Flury-Stamm gegeben sein mußte.

Für die Untersuchung der Seren auf komplementbindende Antikörper standen 10 virushaltige und 6 nicht-virushaltige Gehirne zur Verfügung.

Bei der Prüfung der Flury-Antiseren in der KBR zeigte sich in 90 Ansätzen von Kaninchenserum in 71,2% der Fälle bei Verwendung von Gehirnmaterial tollwutinfizierter Tiere als Antigen eine positive Reaktion; während dies für Meerschweinchenserum nur 9,7% waren. Dabei interessierte es, ob der Zeitpunkt der Serumgewinnung, d.h. Serumgewinnung nach einer bestimmten Anzahl von Injektionen, einen Einfluß auf das Ergebnis der KBR besitzt. Da die Zahl der positiv reagierenden Meerschweinchenserum zu gering war, konnten dazu nur die Kaninchenserum herangezogen werden. Bei diesen lag der Titer bei Verwendung virushaltiger Antigene nach der 4. Applikation am tiefsten - es wurde nie eine höhere Verdünnungsstufe als 1 : 10 erreicht; bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene reagierten diese Seren 100% negativ. Nach der Booster-Injektion wurden mit virushaltigen Antigenen die relativ höchsten Titer erzielt : 12,1% reagierten bis 1 : 40. Es konnte beobachtet werden, daß mit der Anzahl an Injektionen die Häufigkeit der positiven Reaktionen bei Prüfung virushaltiger Antigene zwar zunahm; gleichzeitig aber eine Zunahme an unspezifischen Reaktionen, die bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene auftraten, festzustellen war. Diese Prozentsätze lagen nach der 4. Vaccination bei 0%, stiegen dann aber kontinuierlich bis zu 59,9% nach der Booster-Injektion.

Das untersuchte positive Kaninchen-Vergleichsserum reagierte bei Verwendung von virushaltigem Antigenmaterial in 87,9% positiv; während das positive Meerschweinchen-Vergleichsserum weder mit virushaltigem noch nicht-virushaltigem Antigenmaterial eine Reaktion zeigte. Wobei jedoch zu berücksichtigen ist, daß längere Lagerzeit in der Tiefkühltruhe (-20 Grad C) die Avidität der Vergleichsseren beeinflussen haben könnte.

Um die Treffsicherheit der KBR in ihrer Spezifität abzugrenzen, wurden die Hyperimmunseren mit Gehirnmaterial nicht infizierter Tiere getestet. Dabei zeigte sich für das positive Kaninchen-Vergleichsserum in nur 40 % (Meerschweinchenserum 100%) eine negative KBR; während der Prozentsatz für die Flury-Antiseren der Kaninchen bei 47,3 % (Meerschweinchen 69,2%) negative Reaktionen lag.

Zur weiteren Abgrenzung einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion wurden Seren untersucht, die von den Versuchstieren vor Immunisierungsbeginn gewonnen waren - die also weder Antikörper gegen den Flury-Stamm

noch solche gegen Hühnerembryomaterial enthalten konnten. Auch diese Seren zeigten einen hohen Prozentsatz an unspezifischen Reaktionen: bei virus-haltigen Antigenen 60 % und bei nicht-virushaltigen Antigenen 65% positiver Ausfall der KBR. Jedoch ist auffallend, daß dies nur für Kaninchen-Normalseren zutrifft; während sowohl Meerschweinchen- als auch Pferde- und Rinder-Normalseren weder mit virushaltigen noch nicht-virushaltigen Antigenen nie unspezifische Reaktionen zeigten. Der hohe Prozentsatz unspezifischer Reaktionen der bei den Kaninchenseren auftrat, scheint diese Tierart, wie auch BINDRICH (14) betont, für die Gewinnung von Tollwut-Hyperimmunseren ungeeignet zu machen. VILLEMONT und PROVOST (150) empfehlen Pferde und Rinder als geeignetste Serumpender für rabizide Hyperimmunseren, was in eigenen Versuchen zumindest im Hinblick auf das Nicht-Auftreten unspezifischer Reaktionen bestätigt werden konnte. Wenn auch bei Meerschweinchen-Normalseren keine unspezifischen Reaktionen auftraten, so muß bei eventueller Verwendung dieser Tierart zur Hyperimmunserumgewinnung beachtet werden, daß die rabiziden Meerschweinchen-seren in einem sehr viel geringeren Prozentsatz in der KBR eine positive Reaktion als rabizide Kaninchenseren zeigten.

Daneben wurden Seren untersucht, die keine Antikörper gegen den Flury-Stamm, sondern nur solche gegen Hühnerembryomaterial enthielten. Auch diese Seren zeigten wiederum einen hohen Prozentsatz an unspezifischen Reaktionen. Die sog. S-Seren (von mit psittakosevirushaltigem Hühnerembryomaterial infizierten Tieren gewonnen) die von Kaninchen stammten, zeigten bei virushaltigem Antigenmaterial in 79% und bei nicht-virushaltigem Antigenmaterial in 43,7% der Fälle ein positives Ergebnis der KBR; während dies für die entsprechenden Meerschweinchen-seren nur 3,3% bzw. 9,9% ausmachte. Am häufigsten traten unspezifische Reaktionen bei den Kaninchen-Anti-Embryogehirn-Seren (diese Versuchstiere wurden mit nicht-virushaltigem Hühnerembryogehirnmaterial, das in derselben Art und Weise verarbeitet und appliziert war wie virushaltiges Flury-Material, infiziert) auf: bei virushaltigen Antigenen in 88% und bei nicht-virushaltigen Antigenen sogar in 100% der Fälle; wobei zu berücksichtigen ist, daß diese Seren von nur 2 Kaninchen gewonnen wurden, so daß der Fehler der kleinen Zahl nicht ausgeschlossen werden kann. Die entsprechenden Meerschweinchen-seren zeigten zwar keine bzw. in 40% der Fälle Hemmung der Hämolyse; dafür trat jedoch sehr häufig Eigenhemmung auf (33,4% bzw. 20%). Insgesamt gesehen lag die Anzahl der jeweils auftretenden Eigenhemmungen bei den verschiedenen untersuchten Seren um 10 % - meist darunter - .

Zusammenfassend muß darauf hingewiesen werden, daß die Seren, die ausschließlich Antikörper gegen Hühnerembryomaterial - also keine Antikörper gegen den Flury-Stamm - enthielten, in der KBR in höherem Maße positive Reaktionen zeigten als die Flury-Antiseren und auch die positiven Vergleichsseren.

Die oben für die Kaninchen-Hyperimmunseren angeführten Ergebnisse der KBR wurden aus den Durchschnittsreaktionen aller 5 verwendeten Tiere gewonnen. Daneben wurde geprüft, ob einige dieser 5 Tiere vom Durchschnitt abweichende Ergebnisse zeigten - sowohl in der Häufigkeit der positiven als auch der unspezifischen Reaktionen. Dies traf für das Serum von Kaninchen Nr. 3 zu, das bei virushaltigen Antigenen 20% unterhalb des Durchschnittes der positiven Reaktionen lag und dazu am häufigsten Eigenhemmung aufwies. Während Kaninchen Nr. 1, 4 und 5 in der Häufigkeit der positiven Reaktionen über dem Durchschnitt lagen. Bei Untersuchungen von nicht-virushaltigen Antigenen reagierten die Seren von Kaninchen Nr. 1 und Nr. 2 prozentual häufiger negativ als der Durchschnitt. Somit wäre in vorliegenden Untersuchungen Kaninchen Nr. 1 für die Hyperimmunserum-Gewinnung am günstigsten zu verwenden, da dieses Serum verglichen mit den anderen den Vorteil hatte, daß es mit virushaltigen Antigenen über dem Durchschnitt der positiven Reaktionen lag; und gleichzeitig bei nicht-virushaltigen Antigenen am häufigsten negativ reagierte.

Die zur Diagnostik verschiedener Virusarten herangezogene Erkenntnis, daß bei der KBR von einer bestimmten erreichten Titerhöhe an Aussagen über die Spezifität der Reaktion gemacht werden können, wurde für das Tollwutvirus für eine Titerhöhe von 1:10 geprüft. Dieser Vergleich konnte jedoch nur für Kaninchenseren angestellt werden, da die Meerschweinchen-Flury-Antiseren nie höhere Titer als 1:10 erreichten. Bei Untersuchung des positiven Kaninchen-Vergleichsserums wurde mit nicht-virushaltigem Antigenmaterial die Verdünnungsstufe 1:10 nie überschritten; während dies bei virushaltigem Antigenmaterial in 15,1% der Fälle geschah. Für die Flury-Antiseren lagen bei virushaltigen Antigenen sogar 25,4 % der positiven Reaktionen höher als 1:10; während dies bei nicht-virushaltigen Antigenen nur 7,8% waren. Daneben zeigten jedoch alle untersuchten Vergleichsseren - sowohl diejenigen, die weder Antikörper gegen den Flury-Stamm und Hühnerembryomaterial, als auch die, die nur Antikörper gegen Hühnerembryomaterial enthielten -

in ähnlichen Prozentwerten höhere Titer als 1:10, sowohl bei nicht-virushaltigem als auch virushaltigem Antigenmaterial. Bei den Anti-Embryogehirn-Seren lagen die Titer bei virushaltigen Antigenen in 48% und bei nicht-virushaltigen Antigenen sogar in 75% der Serumansätze höher als 1:10. Somit war es also unmöglich, mit der Höhe einer bestimmten erreichten Titerstufe eine Aussage über die Spezifität der KBR für Tollwut machen zu können.

Bei verschiedenen Virusarten - auch bereits (2, 143, u.a.) für das Tollwutvirus beschrieben - erfährt die KBR in der Kältebindung eine Titersteigerung - Dies wurde in vorliegenden Versuchen für das Tollwutvirus geprüft, um wie oben erwähnt einen eventuell erzielten höheren Titer als spezifische Reaktion erkennen zu können. Dazu wurden nur Kaninchenserum herangezogen. Bei Untersuchung eines virushaltigen Antigens trat bei dem positiven Vergleichsserum in der Wärmebindung Hämolyse auf; während in der Kältebindung ein Titer von 1:10 erreicht wurde. Bei Prüfung eines nicht-virushaltigen Antigens trat in der Kältebindung eine Titersteigerung um eine Stufe (von 1:5 auf 1:10) auf. Die Prüfung der Flury-Antiseren ergab bei virushaltigen Antigenen für 6 Seren, die in der Wärmebindung negativ reagierten, in der Kältebindung (von einer Eigenhemmung abgesehen) ein positives Ergebnis; wovon eines dieser Seren in der Kältebindung sogar einen Titer von 1:40 erreichte. Die untersuchten Flury-Antiseren zeigten mit virushaltigen Antigenen in der Kältebindung in 50% einen Titeranstieg um 1 Stufe, in 14,3% einen solchen um 2 Stufen, während in je 7,1% sogar ein Titeranstieg um 3 bzw. 4 Stufen auftrat. D.h. also, daß 78,5 % der geprüften Flury-Antiseren bei virushaltigen Antigenen in der Kältebindung einen Titeranstieg gegenüber der Wärmebindung erfuhren. Jedoch war auch bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene in der Kältebindung ein Titeranstieg zu erkennen; hier reagierten sogar 87,5 % der untersuchten Serumproben mit einer Titersteigerung. Was bedeutet, daß bei Verwendung nicht-virushaltiger Antigene der Anstieg um 9% höher lag als bei virushaltigen Antigenen. Der Wert dieser Titersteigerungen wird weiterhin dadurch eingeschränkt, daß alle Vergleichsseren in der Kältebindung ebenfalls z.T. beträchtliche Titersteigerungen zeigten. Somit läßt also auch der Titeranstieg, der bei Ausführung der KBR in der Kältebindung erzielt wurde, keine Aussage über die Erhöhung der Spezifität der KBR zur Tollwutdiagnostik zu.

Neben den bisher aufgezeigten Ergebnissen der Versuche, die im wesentlichen im Hinblick auf die verwendeten Hyperimmun- und verschiedenen Ver-

gleichsseren beleuchtet wurden, soll nun auf den Einfluß des verwendeten Antigenmaterials auf die KBR eingegangen werden. In Übereinstimmung mit BINDRICH (14) u. a. (144, 125, 37, 87) konnte festgestellt werden, daß sich zur Durchführung der KBR eine 20%ige Antigensuspension besser eignet, als eine 40%ige. Im Gegensatz zu anderen Autoren (2, 25, 138) die eine höhere Konzentration bevorzugen, da diese die Spezifität der Reaktion erhöhe. In vorliegenden Versuchen zeigte sich für die 40%ige Suspension keine Erhöhung der Spezifität gegenüber der 20%igen; wobei für die 20%ige Suspension der Vorteil einer leichteren Ablesbarkeit hinzukommt, während das Antigenmaterial zur Durchführung der Präzipitationsreaktion im Agargel unverarbeitet verwendet wurde.

Auch wurde geprüft, ob das in der KBR untersuchte, von verschiedenen Tierarten stammende Antigenmaterial das Ergebnis der KBR beeinflusst. Es wurden Gehirne von Karnivoren, Herbivoren und einem Omnivor geprüft. Dabei zeigten die Gehirne der Karnivoren die verhältnismäßig günstigsten Ergebnisse: bei nicht-virushaltigen Antigenen 47,1% negative Reaktionen (gegenüber 36,3% -Herbivoren- bzw. 33,3% -Omnivor-); während bei virushaltigen Antigenen nur 68% positive Reaktionen gegenüber 68,7% bei Herbivoren und sogar 91,8% beim Omnivor auftraten; wobei für letzteren allerdings der Fehler der kleinen Zahl zu berücksichtigen ist. Es scheinen also die Gehirne von Karnivoren - soweit aus der Anzahl der untersuchten Tiere Rückschlüsse gezogen werden können - als Antigene den höchsten Gehalt an komplementbindender Aktivität zu besitzen.

Neben der Komplementbindungsreaktion wurde in vorliegenden Versuchen die Brauchbarkeit der Präzipitationsreaktion im Agargel zur serologischen Diagnose der Tollwut untersucht. Zur Prüfung der Seren auf ihren Gehalt an präzipitierenden Antikörpern wurden die oben angeführten 10 virushaltigen und 6 nicht-virushaltigen Gehirne in unbearbeitetem Zustand verwendet. Die Versuchsanordnung erfolgte in Anlehnung an VILLEMONT und PROVOST (147, 148, 150), die die Präzipitationsreaktion im Agargel als eine der treffsichersten und spezifischsten Methoden zum Nachweis der Tollwut angeben. Obwohl eine genügend große Anzahl von sowohl Hyperimmun- und Vergleichsseren als auch von virushaltigen und nicht-virushaltigen Antigenen geprüft wurde, trat nie eine Präzipitationsbande in Erscheinung.

Die Applikation des Flury-Stammes an Kaninchen, Hühner und Meerschweinchen führte somit bei der angewandten Methodik bei diesen Tieren zu keiner im Agargel erfaßbaren Bildung präzipitierender Antikörper. Im Gegensatz zu VILLEMONT und PROVOST (147), die auch bei Verwendung von Flury-Antiserum eine spezifische Reaktion nachweisen konnten; wobei Verff. allerdings Eselserum untersuchten. Auch wurde dieses Serum von PETER (112) in der Präzipitationsreaktion geprüft; er konnte die Ergebnisse von VILLEMONT und PROVOST nur teilweise bestätigen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde versucht, mit Hilfe des Tollwutvirus-Flury-Stammes Seren mit komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern zu gewinnen.
2. Als hyperimmunisierendes Antigen für 8 Meerschweinchen, 4 Kaninchen und 5 Hühner diente virushaltiges Hühnerembryonenmaterial, das durch Züchtung eines HEP-Stammes über 15 bzw. eines LEP-Stammes über 3 Hühnereipassagen gewonnen war.
3. Der Nachweis des Flury-Stammes in der zur Immunisierung benutzten Eikultur erfolgte sowohl an saugenden Mäusen als auch an 3-Tage vorbebrüteten Hühnereiern.
4. Zur Ermittlung der Höhe des Virustiters wurde mit Erfolg das 3 Tage vorbebrütete Hühnerei herangezogen. Die Titration erfolgte bis zu einer Verdünnungsstufe von 1 : 3 000. Damit war die LD₁₀₀-Grenze nicht erreicht.
5. In der KBR sowohl als auch in der Präzipitationsreaktion im Agargel wurden 10 virushaltige bzw. 6 nicht-virushaltige Gehirne geprüft. Die Gehirne mit Virusgehalt stammten von natürlich infizierten Tieren. Während das Antigenmaterial zur Durchführung der Präzipitationsreaktion in unverarbeitetem Zustand verwendet wurde, wurde für die KBR eine 20%ige Gehirnsuspension gegenüber einer 40%igen als die günstigere ermittelt.

6. Die Ermittlung des günstigsten Zeitpunktes zur Gewinnung der Seren zeigte, daß mit der Anzahl der Applikationen bei Prüfung virushaltiger Antigene die Häufigkeit der positiven Reaktionen in der KBR zunahm; gleichzeitig jedoch ergab sich für nicht-virushaltige Antigene ebenfalls eine Zunahme der positiven Reaktionen in der KBR.
7. Die Höhe eines bestimmten in der KBR erreichten Titers ließ keine Aussage über die Spezifität der Reaktion zu.
8. Bei Untersuchungen der Kaninchenserum in der Kältebindung wurde gegenüber der Wärmebindung fast regelmäßig ein Titeranstieg erzielt, teilweise bis zu 4 Verdünnungsstufen. Trotz dieser Titersteigerung war keine Erhöhung der Spezifität erkennbar, da bei Verwendung von nicht-virushaltigen Antigenen häufiger ein Titeranstieg als bei virushaltigen Antigenen beobachtet wurde.
9. Die von Kaninchen Nr. 1 gewonnenen Antiseren gegen den Flury-Stamm zeigten die günstigsten Ergebnisse : bei Verwendung virushaltiger Antigene reagierten sie am häufigsten positiv und bei nicht-virushaltigen Antigenen am häufigsten negativ.
10. Die Gehirne von Karnivoren scheinen den höchsten Gehalt an komplementbindender Aktivität (d.h. wahrscheinlich auch an Virus) zu besitzen.
11. Bei 90 Ansätzen mit Kaninchen-Flury-Antiseren gegen virushaltige Antigene traten in 71,2% (gegen nicht-virushaltige Antigene in 47,3%) positive Reaktionen auf. Bei Prüfung der Kontrollseren zeigte sich in teilweise höheren Prozentwerten Hämolysehemmung.
Bei Meerschweinchen-Kontrollseren traten zwar nur selten unspezifische Reaktionen auf; dafür konnten in 41 Ansätzen von Meerschweinchen-Flury-Antiseren gegen virushaltige Antigene nur 9,7% positive Reaktionen beobachtet werden.
Rinder- und Pferdenormalseren zeigten weder mit virushaltigen noch mit nicht-virushaltigen Antigenen Hämolysehemmung.
12. In der Präzipitationsprobe im Agargelverfahren waren in Flury-Antiseren präzipitierende Antikörper nicht nachweisbar.
13. Bei der angewandten Versuchsanordnung ließen sich durch Immunisierung mit dem Flury-Stamm Seren mit ausreichendem Gehalt an komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern für die Routinediagnostik der Rabies nicht erhalten.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ALOSI, C.: Comportamento della frazioni protideniche in cani cacciati contro la rabbia. - *Acta med. vet. Napoli* 2 (1956), 555.
- 2) ANDO, K., ISHII, K., IRIZAWA, I., SHIMADA, K., KATO, T. und MURAHAMI, H.: Studies on the immunological diagnosis of the animals suspected of rabies. - *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 6 (1953), 659.
- 3) BABES, V. zit. nach Kraus, R., Gerlach, F., Schweinburg, F. *Lyssa bei Mensch und Tier*. Berlin, Wien 1926.
- 4) BARONI, V., CIUCA, M. und JONESCU-MIHAIESTI: Recherches sur d'anticorps spécifiques dans le sérum et les extraits d'organes d'animaux vaccinés contre la rage. - *C. R. Soc. Biol.* 65 (1908), 96.
- 5) BELL, J., LE, BOER, C.J., DE, HAZZ, E.K. und COX, H.R.: Complement fixing and neutralizing antibody studies on humans vaccinated against rabies. - *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 73 (1950), 225.
- 6) BENAZZI, P. und MANTOVANI, A.: Recherche sulla formazione e persistenza delle anticorpi neutralizzanti e fissanti il complemento in cani vaccinati contro la rabbia. - *At. Soc. It. Sci. Vet.* 7 (1953), 840.
- 7) BERNKOPF, H. und KLIGLER, J.J.: The cultivation of rabies virus in tissue cultures. - *Brit. J. exper. Path.* 18 (1937), 481.
- 8) BERNKOPF, H. und NACHTIGAL, D.: Complement-fixation with sera of animals immunized with rabies virus. - *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 53 (1943), 36.
- 9) BERRY, J.L. und MANN, A.: The complement-binding test in rabies. - *J. Exper. Med.* 12 (1910), 338.
- 10) BERTARELLI, E.: zit. nach Kolle und Wassermann, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* (1913).
- 11) BINDRICH, H. und SCHMIDT, U.: Über die Chloroformresistenz einiger Virusarten. - *Arch. exper. Vet. Med.* 9 (1955), 922.
- 12) BINDRICH, H.: Untersuchungen über den "Flury"-Stamm des Tollwutvirus. I Zum Infektionsspektrum. II. Immunisierungsversuche. - *Arch. exper. Vet. Med.* 10 (1956), 211 und 226.
- 13) BINDRICH, H. und KUWERT, E.: Zur Diagnose der Tollwut (vorläufige Mitteilung). - *Mhefte Vet. Med.* 12 (1957), 380.
- 14) BINDRICH, H. und KUWERT, E.: Die diagnostische Bedeutung der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut. - *Arch. exper. Vet. Med.* 11 (1957), 1015.
- 15) BINDRICH, H. und KUWERT, E.: Unveröffentlichte Versuche (1958).
- 16) BINDRICH, H., POTEI, K. und KUWERT, E.: Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an komplementbindendem Antigen und gewebliche Veränderungen im Gehirn tollwutkranker Hunde nach experimenteller Infektion. - *Arch. exper. Vet. med.* 12 (1958), 134.

- 17) BINDRICH, H. und OLECHNOWITZ, A.F.: Untersuchungen über die Einwirkungen von Hyaluronidase auf das Virus der Tollwut bei Hunden. Arch. exper. Vet. Med. 13 (1959), 523.
- 18) BRANDENBURG, H.: Zur Lyssadiagnostik. - Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 65 (1952), 147.
- 19) BRANDENBURG, H.: Zum diagnostischen Tierversuch auf Tollwut. - Zbl. Bakt. I Orig. 159 (1952/53), 23.
- 20) BOER, J. DE und COX, H.R.: Specific complement-fixing diagnostic antigens for neurotropic viral diseases. - J. Immun. 55 (1947), 193.
- 21) BULLING, E.: Die Züchtung des Tollwutvirus im Hühnerei. - Zbl. Bakt. I Orig. 167 (1956), 1.
- 22) BULLING, E.: Die Komplementbindungsreaktion als Hilfsmittel für die Tollwutdiagnostik. - Zbl. Bakt. I Orig. 169 (1957), 161.
- 23) BURMEISTER, W.H.: The absence of demonstrable specific antibodies in rabies caused by fixed virus. - J. Infect. Dis. 17 (1915), 423.
- 24) BURTIN, P. zit. nach FEINBERG (Burtin 1956, Feinberg 1958).
- 25) CAPPONI, M. und SUREAU, P.: Une épidémie de rage canine à Dalat. Bull. Soc. Path. Exot. 48 (1955), 616.
- 26) CASALS, J. und PALACIOS, R.: Complement-fixation in encephalitis and rabies virus infections. - Science 93 (1941), 162.
- 27) CASALS, J. und PALACIOS, R.: The complement-fixation test in the diagnosis of virus infections of the central nervous system. - J. Exper. Med. 74 (1941), 409.
- 28) CENTANNI, E.: Die Diagnose der Tollwut mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion. - Zbl. Bakt. I Orig. 41 (1908), 706.
- 29) CHABAUD, M.A., SERIE, C. und ANDRAL, L.: Electrophorèse et diagnostic de la rage. - Ann. Inst. Pasteur 88 (1955), 420.
- 30) CHRIST, P., HARNONCOURT, K., SIMROCK, W. und WACHENDÖRFER, G.: Erfahrungen mit der Tollwutprophylaxe. - Deutsch. Med. Wschr. 16 (1961), 803.
- 31) COX, H.R.: Behringwerk-Mitteilungen 29 (1954), 87.
- 32) DAWSON, J.R.: Infection of chickens and chickembryos with rabies. - Science 89 (1939), 300.
- 33) DEPOUX, R. und MERVEILLE, P.: Sur la valeur de la réaction de déviation du complément dans le diagnostic de la rage. - Ann. Inst. Pasteur, Paris 90 (1954), 182.
- 34) DEPOUX, R. und ORIO, J.: Deuxième note sur la réaction de fixation du complément dans le diagnostic de la rage. - Bull. Soc. Path. Exot. 51 (1958), 157.
- 35) DOBROWOLSKAJA, N.A.: Zur Frage der Komplementbindungsreaktion bei Lyssa. - Zbl. Bakt. I Orig. 56 (1910), 177.

- 36) DONATI, A. und SATTA, G.: Sulla deviazione del complemento nella rabbia. - ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 45 (1908), 596.
- 37) ENDE, M. VAN DEN, POLSON, A. und TURNER, G. S.: Experiments with the soluble antigen of rabies in suckling mouse brains. - J. Hyg. 55 (1957), 361.
- 38) ERNST, W.: Tollwutuntersuchungen. - Münch. Tierärztl. Wschr. 77 (1926), 33.
- 39) ESPANA, C. und HAMMON, W. D.: An improved benzene-extracted complement fixing antigen for certain neurotropic viruses. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66 (1947), 101.
- 40) ETCHEBARNE, M. P., BERNAL, P. G. und LAYTON, G. R.: Purification of rabies virus; importance of the fluorescent antibody technique. Ref. in Biol. Abstr. Sect C 35 (14) 1960 unter 38682.
- 41) FALKE, D.: Versuche zur Reinigung von S-Antigenen des Tollwutvirus. - Mhefte prakt. Tierhk. 12 (1960), 181.
- 42) FALKE, D. und UHLMANN, W.: Zur Frage der serologischen Tollwutdiagnose mit Hilfe des Komplementbindungstestes. - Mhefte prakt. Tierhk. 9 (1957), 241.
- 43) FEINBERG, R.: Studies on non-precipitating antibody coexisting with precipitating antibody. - J. Immun. 81 (1958), 14.
- 44) FERREIRA, A. und CONTE, H., SA VIANA: Recherches des substances rabicides dans le sang des chiens vaccinés contre la rage. - Arq. Inst. bact. Câmara Pestana (part.) 6 (1930), 27.
- 45) FOLEY, R. J.: A Practitioner's Experience with rabies vaccines. - Vet. Med. 50, 7 (1955), 322.
- 46) FRAS, A. und GRMOVSEK, P.: Dijagnostika bjesnoka pomocu Geldifuzionog precipitin testa. - Ver. Archiv 28 (1958), 253.
- 47) FRIEDBERGER, E.: Hat die Methode der Komplementablenkung eine Bedeutung für die Diagnose der Lyssa? - Wien. klin. Wschr. 20 (1907), 879.
- 48) GALLIA, F.: Immunologische Differenzierungen zwischen dem Virus fixe-Stamm Pasteur und dem paralytischen Tollwutstamm Venezuela. - Can. J. Comp. Med. 10 (1946), 223 (englisch).
- 49) GALLOWAY, L. A. und ELFORD, W. J.: The size of the virus of rabies (fixed strain) by ultrafiltration analysis. - J. Hyg. 36 (1936), 532.
- 50) GILDEMEISTER, E., HAAGEN, E. und WALDMANN, O.: Handbuch der Viruskrankheiten. - Band 2 (1939) Gustav Fischer Verlag, Jena.
- 51) GOLDWASSER, R. A. und KISSLING, R. E.: Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigen. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 98 (1958), 219.

- 52) GRASSET, N. und PASCU, A.: Etude de la diffusion en gélose d'antigènes de la rage fixe obtenus sur culture de tissus. - Ann. Inst. Pasteur 101, (1961), 639.
- 53) GREVAL, S. D.: On rabies. Complement-fixation in rabies, the technique, its purpose and associated considerations. Ind. J. Med. Res. 20, 913 ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 110 (1933), 345.
- 54) GRIEM, W.: Die Verwendung der weißen Maus zur Tollwutdiagnose. Mhefte Vet. Med. 8 (1953), 267.
- 55) HABEL, K.: Effect of immunity to challenge and antibody response of variation in dosage schedule of rabies vaccine in mice. - Bull. Wld. Hlth. Org. 14 (1956), 613.
- 56) HEINIG, A.: Zur Komplementbindungsreaktion (KBR) bei Tollwut mit apathogenen Antigenen. - Mh. Vet. Med. 16 (1961), 849.
- 57) HELLER, O. und TOMARKIN, E.: Ist die Methode der Komplementbindung zum Nachweis spezifischer Stoffe bei Hundswut und Vaccine brauchbar? - Dtsch. med. Wschr. 33 (1907), 795.
- 58) HEMPT, A.: Über eine karbolisierte antirabische Äther-Vaccine und ihren Schutzwert bei Mensch und Tier. - Behringwerk-Mitteilungen 9 (1938), 150.
- 59) HOFF, F.: Behandlung innerer Krankheiten. 10. Aufl. (Stuttgart 1962)
- 60) HOROWITZ-WLASSOWA, L.: Über die Komplementablenkungsreaktion bei der Tollwut. - Zbl. Bakt. I Orig. 98 (1926), 216.
- 61) HOTTA, T.: Zur Diagnose der Tollwut mittels Komplementablenkung. Wien. klin. Wschr. 44 (1928), 1513.
- 62) HUYGELEN, C. und MORTELMANS, J.: Pouvoir rabicide du sérum des ruminants après vaccination au moyen du V. Flury HEP. Bul. Soc. Pat. exot. 52 (1959), 747.
- 63) IMIG, F.: Die Verwertbarkeit der Komplementbindungsreaktion zur Diagnose der Borna'schen Krankheit und der Tollwut. - Vet. Med. Diss. Gießen (1928).
- 64) JASTREMSKY, G.: Zur Frage über die Negrischen Körperchen. - Zbl. Bakt. I Orig. 67 (1913), 65.
- 65) KANAZAWA, K.: Sur la culture in vitro du virus de la rage. - Jap. J. exper. Med. 15 (1937), 17.
- 66) KELSER, R. A.: Chloroform-treated rabies vaccine (preliminary report). - Vet. Bull. 22 (1928), 95.
- 67) KIPPS, A. D., DU, T., NAUDE, W., POLSON, A., SELZER, G. und ENDE, M. VAN DEN: The size distribution of specific antigens in virus infected tissues and their significance. - Ciba Found. Symp. Nat. Vir. 224 (1957).

- 68) KIRK, R.C. und ECKER, E.E.: Time of appearance of antibodies to brain in the human receiving antirabies vaccine. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70 (1949), 734.
- 69) KLÖNE, W.: Laboratoriumsdiagnose menschl. Virus -und Rickettsieninfektionen. Springer-Verlag, Berlin (1953).
- 70) KOLMER, J. A. und TRIST, M.: Non specific complement-fixation with normal rabbit serum - J. Infect. Dis. 18 (1916), 20.
- 71) KONDO, S. und OBANDA, K.: Studies of the complement-fixation reaction in rabies. - J. Jap. Soc. Vet. sci. 252 (1929) ref. in Zbl. Bakt. I Ref. 98 (1930), 341.
- 72) KOPROWSKI, H. und COX, H.R.: Studies on chick embryo adapted rabies virus. I Culture characteristics and pathogenicity. II Pathogenicity for dogs and use of egg adapted strains for vaccination purposes. - J. Immunology 60 (1948), 533.
- 73) KOPROWSKI, H. und BLACK, J.: Studies on chick embryo adapted rabies Virus. - J. Immunology 64 (1950), 185.
- 74) KOPROWSKI, H.: Biological modification of rabies virus as a result of its adaption to chicks and developing chick embryos. - Bull. Wld. Hlth. Org. 10 (1954), 709.
- 75) KOSTREZEWSKI, J.: Untersuchungen über die Blutserumeigenschaften bei den tollwutschutzgeimpften Menschen. - Zbl. Bakt. I Orig. 84 (1920), 106.
- 76) KOZEWALOFF, S.: Über komplementbindende und rabizide Substanzen im Blute wutkranker Kaninchen. - Zbl. Bakt. I Orig. (1910).
- 77) KRAUS, R. und MICHALKA, J.: Komplementbindung als diagnostisches Hilfsmittel bei Lyssa. - Zbl. Bakt. I Ref. 83 (1926), 333.
- 78) KRAUS, R. und MICHALKA, J.: Die Diagnose des Lyssavirus mittels Komplementablenkung mit Koktoimmunogen und Glycerinextrakt. II. Mitteilung. - Zschr. Immunitätsf. 47 (1926), 504.
- 79) KRAUS, R. und TAKAKI, J.: Der Nachweis der neurotrophen Virusarten mittels Komplementablenkung mit Koktoantigenen. Wien. klin. Wschr. 39 (1926), 624.
- 80) KUMA, N.: Infection of the one-day old fertile hen's egg with rabies virus III Some observations on high egg passage (HEP) strains. - Jap. J. med. Sci. Biol. 11 (1958), 31.
- 81) KUWERT, E. und BINDRICH, H.: Untersuchungen über die Antikörperbildung bei der Herstellung von rabiziden Hyperimmunseren am Hund. - Arch. exper. Vet. Med. 12 (1958), 669.
- 82) KUWERT, E. und LIEPENOW, W.: Die Stabilität des Tollwutvirus bei verschiedenen H-Jonenkonzentrationen, verschiedenen Temperaturen und Formaldehydeinwirkung. - Arch. exper. Vet. Med. 13 (1959), 335.

- 83) KUWERT, E.: Komplementbindendes und infektiöses Antigen beim Tollwutvirus. I Das Verhalten der beiden Komponenten im Verlaufe der Virus-fixe-Infektion. II Das Verhalten der beiden Komponenten des Virus bei höheren Temperaturen. - Arch. exper. Vet. Med. 14 (1960/61), 1049 und 15, 1237.
- 84) LÄSSER, E.: Die Diagnose der Tollwut durch Präzipitation. - Zschr. Immun. exper. Ther. 53 (1927), 1.
- 85) LEACH, C.N. und JOHNSON, H.N.: Human rabies, with special reference to virus distribution and titer. - Am. J. Trop. Med. 20 (1940), 335.
- 86) LEPINE, P. und SAUTTER, V.: Etat du virus fixe dans les vaccins antirabiques phéniqués. - C. R. Soc. Biol. 127 (1938), 193.
- 87) LINSERT, H., TEMPLIN, G. und WOLTÈR, R.: Die Komplementbindungsreaktion als Diagnostikum bei Routineuntersuchungen auf Tollwut. Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 72 (1959), 323.
- 88) LOEWENTHAL, W.: Eine Fehldiagnose auf Wut ? - Zbl. Bakt. I. Orig. 101 (1927), 393.
- 89) LUZANNI, L. zit. nach WACHENDÖRFER, G. (1961).
- 90) MACE, D.L. und CORTEZ, F.S.: Immunity status of normal, vaccinated and rabid animals. - J. Am. Vet. Med. Ass. 115 (1949), 24.
- 91) MANSI, W.: The study of some viruses by plate gel diffusion precipitation test. - J. Comp. Path. Ther. 67 (1957), 297.
- 92) MARIE, A.C. und URBAIN, A.: La réaction de fixation dans la rage. - C. R. Soc. Biol. 101 (1929), 561.
- 93) MATSUMOTO, S.: Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. - Virology 17 (1962), 198.
- 94) MCQUEEN, J.L.: Rabies diagnosis. Special application of fluorescent antibody techniques. - Proc. 63rd Meet. US Livestock Sanit. Ass. San Francisco 356 (1959).
- 95) MEAD, T.H.: Purification of rabies soluble antigens. - J. Gen. Microbiol. 27 (1962), 397.
- 96) MECINSKA, J.: Proby nad odczynem wiązania doponiacza i hemaglutinacje przy wścieklźnie. - Ann. Univ. Lublin Sect. D. D. 7, (1954), 169.
- 97) MICHALKA, J.: Tollwut beim Schwein. Beitrag zur Differentialdiagnose der ansteckenden Schweinelähmung. - Wien. tierärztl. Mschr. 29 (1942), 12.
- 98) MORTELMANS, J., PINCKERS, F., HUYGELEN, C. und VANDESTEENE, R.: La rage canine au Ruanda-Urundi. La vaccination sur grande échelle avec le vaccin avianisé Flury LEP. - Bull. Agric. Congo belge 49, (1958), 1307.

- 99) NANI, S.: Indagini sui fenomeni di emoagglutinazione e di adsorbimento nel virus fisso della rabbia. - Arch. Vet. Ital. II/4 (1951).
- 100) NEDRIGAILOFF, W. und SAWTSCHENKO, W.: Über die Anwendung der Komplementbindungsmethode für die Diagnose der Tollwut. - Zschr. Immunitätsf. 8 (1911), 353.
- 101) NEGRI, A.: Zur Ätiologie der Tollwut. Die Diagnose der Tollwut aufgrund der neuen Befunde. - Zschr. Hyg. 44 (1903), 519.
- 102) NIKOLITSCH, M. zit. nach BINDRICH, H. (1956).
- 103) OHDER, H.: Über die Häufigkeit von Negrikörperchen in verschiedenen Gehirnteilen. - Mhefte prakt. Tierhk. 11 (1959), 123.
- 104) OLECHNOWITZ, A.F. und KUWERT, W.: Zur Lokalisation der Antikörper in den Proteinfractionen des rabiziden Hundehyperimmunserums. - Arch. exper. Vet. Med. 14 (1960), 1073.
- 105) OSOLINA, E. und ENGLERT, HK.: Erfahrungen mit der Komplementbindungsreaktion bei Tollwut. - Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 75 (1962), 66.
- 106) OUCHTERLONY, Ö. (1948) zit. nach MANSI (1957).
- 107) OUDIN, J. (1946) zit. nach MANSI (1957).
- 108) PAARMANN, E.: Tollwutuntersuchungen. - Verl. Münch. tierärztl. Wschr. 68 (1955), 122.
- 109) PAIC, M. und KRASSUOFF, D., HABER, L., REINIE, L. und VOET, J.: Dimensions approximatives des ultravirus et des bactériophages d'après les données fournies par l'ultrafiltration. - Ann. Inst. Pasteur 60 (1938), 227.
- 110) PASTEUR, L.: Méthode pour prévenir la rage après morsure. - C.R. Acad. Sci. (Paris) 101 (1885), 765.
- 111) PERGALLO, J.: Coltura del virus rabbico nella membrana corion-allantoidea dell'embrione di pollo. - Ann. Igiene 47 (1937), 420.
- 112) PETER, M.: Die Diagnose der Tollwut unter besonderer Berücksichtigung serologischer Methoden und vergleichende Versuche mit der Komplementbindungsreaktion und der Präzipitation im Agarmilieu. - Vet. Med. Diss. Berlin (1961).
- 113) PITZSCHKE, H.: Erfahrungen mit dem Sellers-Quetschpräparat und dem Mäuse-Tierversuch bei der Laboratoriumsdiagnose der Tollwut. - Zbl. Bakt. I Orig. 172 (1958), 197.
- 114) PLOTZ, H. und REAGAN, R.: In vitro cultivation of the street virus of rabies. - Science 95 (1942), 102.
- 115) POLSON, A. und WESSELS, P.: Particle size of soluble antigen of rabies virus. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84 (1953), 317.

- 116) POTEL, K.: Das histologische Verhalten des Zentralnervensystems bei Hunden nach Impfung mit einer eiadaptierten Lebendvaccine (Flury-Vakzine) gegen Tollwut. - Arch. exp. Vet. Med. 12 (1958), 612.
- 117) REAGAN, R. L., DAY, W. C., HARMON, M. P. und BRUECKNER, A. L.: Electron microscopic study of virus of rabies. - Am. J. Vet. Res. 14, (1953), 111.
- 118) REAGAN, R. L., CHANG, S. und BRUECKNER, A. L.: Studies by electron microscopy of fixed (Pasteur) rabies virus, street rabies virus and egg adapted Flury strain of rabies. - Texas Rep. Biol. Med. 13 (1955), 356.
- 119) REED, L. J. und MUENCH, A.: A simple method of estimating fifty per cent end-points. - Am. J. Hyg. 27 (1938), 493.
- 120) REMLINGER, P.: Le passage du Virus rabique à travers les filtres. - Ann. Inst. Pasteur 17 (1903), 834.
- 121) REMLINGER, P. und BAILLY, J.: Action de la congélation sur le virus rabique. - C. R. Soc. Biol. 116 (1934), 407.
- 122) REMLINGER, P.: Les vaccins pasteurien et le vaccin Flury dans la vaccination des animaux. - Bull. Off. int. Epiz. 45, (1956), 592.
- 123) ROOTS, E.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Gehirnen bei der experimentellen Tollwutinfektion. - Z. Naturforsch. 176 (1962), 326.
- 124) SCHAAF, J., WEIDLICH, N. und STURM, G.: Beitrag zur Diagnose und Differentialdiagnose der Tollwut. - Mhefte prakt. Tierhk. 8, (1956), 108.
- 125) SCHINDLER, R.: Die Komplementbindung als Hilfsmittel für die Differentialdiagnose der Viruskrankheiten des Hundes. - Mhefte prakt. Tierhk. 9 (1957), 315.
- 126) SCHINDLER, R.: Untersuchungen über die Bedeutung eines bei Karnivoren vorkommenden Speichelfaktors mit Hyaluronidase ähnlicher Wirkung für die Übertragung der Tollwutinfektion. Habilitationsschrift Hamburg. Z. Tropenmed. 10, 450 und 11, 71 (1959/60).
- 127) SCHINDLER, R.: Studies on the pathogenesis of rabies. - Bull. World Hlth. Org. 25 (1961), 119.
- 128) SCHINDLER, R.: Untersuchungen über das Komplementbindungsantigen des Tollwutvirus. - Zbl. Bakt. I Orig. 186 (1962), 139.
- 129) SCHOOP, G.: Über den derzeitigen Tollwutseuchenzug. - Z. Hyg. 138 (1954), 415.
- 130) SCHOOP, G. und KAUER, E.: Die Verbreitung der Tollwut in Afrika 1947-1953. In Weltseuchenatlas. - World Atlas of Epidemic Diseases, herausgeg. v. E. Rodenwaldt u. H. J. Juratz, III/57 bis III/60, Hamburg: Falk 1956.

- 131) SCHOOP, G.: Die Epidemiologie der wichtigsten Zoonosen. - Münch.med. Wschr. 101 (1959), 1337.
- 132) SCHULTZ, E. W., BULLOCK, L. T. und BREWER, H.: Studies on the antigenic properties of the ultraviruses. III The antigenic property of rabies virus. - J. Immun. 15, (1928), 265.
- 133) SCHWEINBURG, W.: Über den Nachweis von Lyssavirusin verschiedenen Organen. - Zbl. Bakt. I Orig. 123 (1932), 434.
- 134) SEEMANN, A.: Über das Vorkommen von eosinophilen Einschlusskörperchen im Ammonshorn von Katzensgehirnen (Beitrag zur Differentialdiagnostik der Tollwut der Katze). - Med. Diss. Dresden (1960).
- 135) SEMPLE, D.: On the nature of rabies and antirabic treatment. Brit-M.J., London 2 (1919), 333.
- 136) SHARMA, P. R.: A simple method to diagnose rabies by double diffusion test. - J. Vet. Husb. Res. 3 (1958), 35.
- 137) STARKE, G. und SEIDL, H.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Haemagglutination des Tollwutvirus. - Zschr. Hyg. 4, 118 (1958).
- 138) TAGUCHI, K., MOTO, B., TAKEHARA und URIN, I.: On the complement fixation test of animals suspected of rabies. - J. Jap. Bakt. 12 (1957), 866.
- 139) TAKAKI, I., BONIS, A. und KOREF, O.: Die Komplementablenkung mittels Koktoantigene als Methode zur Identifizierung und Differenzierung des filtrierbaren Virus. - Zschr. Immun. 47 (1926), 431.
- 140) TANG, F. F. und CASTANEDA, M. R.: Complement fixation reaction with rabies and herpes Viruses. - J. Immun. 14 (1929), 451.
- 141) THIERY, G.: Que peut-on attendre de la méthode de précipitation en milieu gélifié pour le diagnostic de la rage dans le région de Dakar. - Rev. Elev. 13 (1960), 251.
- 142) THOMPSON, S. W.: Comparison of some routine laboratory procedures for diagnoses rabies. - Military Med. 121 (1957), 388.
- 143) TRUBINA, L. M.: Zur Frage der Serodiagnostik bei Tollwut. Wopros-sü Virosol. 161 (1957) russisch.
- 144) UEKI, H., KATO, T., OISHI, J., MURAHAMI, H. und SHIMADA, K.: Observations of the time of appearance of Negri-bodies, complement fixing antigens and virulence in mouse brains inoculated with rabies street virus. - Am. J. Vet. Res. 18 (1957), 216.
- 145) UEKI, H.: Time of appearance of Negri bodies, complementfixing antigen, and virulence in the brain of mice inoculated with rabies street virus. - Jap. J. vet. Sci. 23 (1961), 375.

- 146) VAUGHN, J. B., GERHARDT P.: Isolation of Flury Rabies vaccine virus from the salivary gland of a cat. - J. Amer. Vet. Med. Ass. 139 (1961), 221.
- 147) VILLEMONT, J. M. und PROVOST, A.: Précipitation en milieu gélifié du virus rabique par le sérum rabique hyperimmun. - Rev. d'élevage Med. Vet. 11 (1958), 387.
- 148) VILLEMONT, J. M. und PROVOST, A.: Précipitation spécifique du virus rabique en milieu gélifié selon de la méthode d'Oudin-Ouchterlony (technique de Mansi). - C. R. Acad. Sci. Paris 146 (1958), 2694.
- 149) VILLEMONT, J. M. und PROVOST, A.: Etude sur l'antigène soluble du virus rabique. - Ann. Inst. Past. 96 (1959), 712.
- 150) VILLEMONT, J. M. und PROVOST, A.: Diagnostic rapide de la rage par le test précipitation en milieu gélifié. - Proc. XVI the Int. vet. Congr. Madrid 2 (1959), 629.
- 151) WACHENDÖRFER, G.: Die Laboratoriumsdiagnose der Tollwut mit Hilfe der Färbemethoden nach Lentz und Paarmann und des Mäuseversuches. - Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 (1961), 261.
- 152) WACHENDÖRFER, G.: Die Katze als epizootologischer Faktor und als Gefahr für den Menschen im augenblicklichen Tollwutseuchenzug. - Deutsch. tierärztl. Wschr. 69 (1962), 555
- 153) WEBSTER, L. T. und CLOW, A. D.: Propagation of rabies virus in tissue cultures. - J. of exper. Med. 66 (1937), 125.
- 154) WILSON, M. W. und PRINGLE, B. H.: Experimental studies of the agar plate precipitin test of Ouchterlony. - J. Immun. 73 (1954), 232.
- 155) YAOI, H., KANAZAWA, K. und SATO, K.: Ultrafiltration experiments on the Virus of rabies (virus fixe). - Jap. J. exper. Med. 14 (1936), 373.
- 156) YOSHINO, K., KONDO, A., KUMA, N. und TANIGUCHI, H.: Infection of the One-Day Old Fertile Hen's Egg with Rabies Virus. VI Strain Differences in the Egg Adaptability. VII Comparison of Viral Yields Obtained by Inoculation of Eggs of Different Ages with Different Strains and Production of Vaccine. - Arch. f. d. gesamte Virusforschung X, 684 und 698 (1960).
- 157) ZELL, C. A.: Serodiagnosis of rabies. - Am. J. Vet. Med. Ass. 8 (1913), 637.

Herrn Professor Dr. Schoop möchte ich für die Überlassung des Themas und die mir bei der Arbeit gewährte Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Mein weiterer Dank gilt den Damen und Herren der virologischen Abteilung, die mir bei allen Versuchen stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

LEBENS LAUF

Am 20.2.1937 wurde ich in Gießen als Sohn des Dr.med.vet. Wilhelm Manz und seiner Ehefrau Marga, geb. Kahl geboren.

Von 1943 bis 1947 besuchte ich die Grundschule in Undenheim/Kreis Mainz. Anschließend trat ich in die Sexta der Oberrealschule, Alzey, ein. Die Quinta absolvierte ich am Paul Schneider Gymnasium in Meisenheim/Glan. Von 1949 an besuchte ich das naturwissenschaftliche Gymnasium in Worms, wo ich 1956 mein Abitur bestand.

Im SS 56 immatrikulierte ich mich an der Joh. Gutenberg Universität Mainz für die Fächer Psychologie und Volkswirtschaft. Nach 2 Semestern jedoch schrieb ich mich in die medizinische Fakultät um. 1959 bestand ich in Mainz das Physikum, studierte anschließend je 1 Semester in München und Kiel, und immatrikulierte mich im WS 60/61 an der Joh. Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt. Hier bestand ich im Februar 1963 das medizinische Staatsexamen.

Frankfurt/M., den 12.11.63

Rolf Manz

Meine akademischen Lehrer waren :

Prof. Dr. Bodechtel (Innere Medizin)
Prof. Dr. Gärtner (Hygiene)
Prof. Dr. Herzberg (HYgiene)
Prof. Dr. Hoff (Innere Medizin)
Prof. Dr. Lang (Physiologische Chemie)
Prof. Dr. Reinwein (Innere Medizin)
Prof. Dr. de Rudder (Kinderheilkunde)
Prof. Dr. Schoop (Zoonosenforschung)
Prof. Dr. Watzka (Anatomie)
Prof. Dr. Zutt (Neurologie und Psychiatrie)

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die der Medizinischen Fakultät Frankfurt/Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

"Versuche zur Gewinnung komplementbindender und präzipitierender Seren gegen das Tollwutvirus unter Verwendung des Flury-Stammes."

im Institut für Zoonosenforschung unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Schoop, mit Unterstützung durch Herrn Dr. G. Wachendörfer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt/M., den 12.11.63

Rolf Manz

